
Masterarbeit

Frau B.Sc.
Vanessa Hänchen

**Einfluss verschiedener Modifi-
kationen zur Steigerung der
Hybridisierungseffizienz in ei-
nem modularen DNS-basierten
Freisetzungssystem an
Titanoberflächen**

Mittweida, 2014

Masterarbeit

Einfluss verschiedener Modifikationen zur Steigerung der Hybridisierungseffizienz in einem modularen DNS-basierten Freisetzungssystem an Titanoberflächen

Autor:
Frau B.Sc. Vanessa Hänchen

Studiengang:
Molekularbiologie/Bioinformatik

Seminargruppe:
MO12w1

Erstprüfer:
Frau Prof. Dr. Petra Radehaus

Zweitprüfer:
Herr Prof. Dr. Dieter Scharnweber

Mittweida, 2014

Bibliografische Beschreibung:

Hänchen, Vanessa

Einfluss verschiedener Modifikationen zur Steigerung der Hybridisierungseffizienz in einem modularen DNS-basierten Freisetzungssystem an Titanoberflächen. 2014. 60 Seiten, 29 Abbildungen, 3 Tabellen, Hochschule Mittweida, Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik. Anfertigung der Arbeit am Max-Bergmann-Zentrum für Biomaterialien, TU Dresden. Masterarbeit, 2014

Englischer Titel:

Influence of Various Modifications on the Hybridisation Efficiency in a Modular DNA-based Immobilisation System for Titanium Surfaces

Kurzbeschreibung:

Um die Revision titanbasierter Knochenimplantate zu vermindern, wurde ein Nukleinsäure-basiertes Immobilisierungssystem entwickelt. Dabei werden einzelsträngige DNS-Sequenzen als Ankerstränge (AS) regioselektiv in die anodische Oxidschicht von Titan eingebaut. Die Doppelstrangbildung der DNS wird genutzt, um Gegenstränge, welche mit bioaktiven Molekülen konjugiert sind, an der Titanoberfläche zu fixieren und *in vivo* kontrolliert freizusetzen.

Um eine Schädigung der Hybridisierungssequenz der AS durch Wechselwirkungen mit der Titanoberfläche zu minimieren wurden kurze ssDNS-Sequenzen als laterale Spacer eingeführt und deren Einfluss auf die Hybridisierbarkeit der AS analysiert. Weiterhin wurde die Hybridisierbarkeit der AS mit verschiedenen Gegensträngen und unter variierten Hybridisierungsbedingungen charakterisiert.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abk[Pleaseinsertintopreamble]rzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Eigenschaften von Luftpassivschichten	1
1.2 Bildung anodischer Oxidschichten	2
1.3 Implantate in Gewebekontakt - Einfluss von Oberflächenmodifizierungen	3
1.4 Oberflächenmodifizierungen für Implanatate in Knochenkontakt . . .	4
1.5 Immobilisierung von bioaktiven Molekülen mittels Oligodesoxyribonukleotid-System	4
2 Zielstellung	7
3 Materialien	9
3.1 Chemikalien	9
3.2 Arbeitslösungen und Puffer	10
3.3 Untersuchungsmaterial	10
3.4 Geräte	13
4 Methoden	14
4.1 Vorbereitung der Titanoberfläche	14
4.2 Oberflächenmodifizierung	14
4.3 Sterilisierung	15
4.4 Hybridisierung	16
4.5 Quantifizierung der immobilisierten Stränge mittels radioaktiver Markierung	16
4.6 Rasterelektronenmikroskopie	17
5 Ergebnisse	18
5.1 Rasterelektronenmikroskopie	18
5.2 Immobilisierung von Ankerstrang mit Zusatz von Spacer	19
5.2.1 Quantifizierung von Ankerstrang und Spacer	19

5.2.2	Adsorptionsmethoden bei Spacerzusatz	21
5.2.2.1	Adsorptionszeit bei simultaner Adsorption	21
5.2.2.2	Sequentielle Adsorption von Ankerstrang und Spacer	23
5.2.2.3	Hybridisierung bei sequentieller Adsorption	25
5.2.2.4	Vergleich von Adsorptionsmethoden bei Hybridisierung	26
5.3	Untersuchungen zur Hybridisierung	27
5.3.1	Hybridisierung verschiedener Gegenstränge	28
5.3.2	Modifizierung von Hybridisierungsbedingungen	30
5.3.3	Modifizierung der Probenvorbereitung auf Sterilisierung	34
6	Diskussion der Ergebnisse	36
6.1	Adsorption in Anwesenheit des Spacers	36
6.1.1	Oberflächenbelegung bei simultaner Adsorption	36
6.1.2	Oberflächenbelegung bei sequentieller Adsorption	38
6.2	Hybridisierung von verschiedenen Gegensträngen	42
6.3	Modifizierung der Bedingungen zur Hybridisierung	45
6.4	Sterilisierungsbedingungen	47
6.5	Einflussfaktoren	48
7	Zusammenfassung und Ausblick	50
8	Summary	52
	Literaturverzeichnis	VIII
	Anhang	IX
A.1	Voruntersuchungen des Ankerstrangs	IX
A.2	Kinetik der Belegungsdichte bei sequentieller Adsorption	X
A.3	Kinetik des Hybrids bei sequentieller Adsorption	XI
	Danksagung	XIII
	Selbstständigkeitserklärung	XIII

Abbildungsverzeichnis

1	Modell des ODN-basierten Immobilisierungssystem.	6
2	Immobilisierung und Hybridisierung	7
3	Prinzip der radioaktiven Markierung	12
4	Elektrochemiezelle	15
6	Belegungsdichte des Ankerstrangs und ko-immobilisierten Spacers . .	20
7	Belegungsdichte des Spacers	21
8	Variation der Adsorptionszeit	22
9	Kinetik von Ankerstrang und Spacer bei Variation der Adsorptionszeit	23
10	Belegungsdichte nach sequentieller Adsorption	24
11	sequentielle und simultane Adsorption	25
12	Hybridisierung bei sequentieller Adsorption	26
13	Hybridisierung bei verschiedenen Adsorptionsmethoden	27
14	Vergleich von Gegensträngen	29
15	Hybridisierungseffizienz	29
16	Hybridisierungsbedingungen	31
17	Hybirdisierungsbedingungen - Kinetik und Stabilität	32
18	Belegung mit GS vs. Zeit-unsteril, 0,8 $\mu\text{mol/l}$ Ankerstrang	33
19	Belegung mit GS vs. Zeit-unsteril, 1,6 $\mu\text{mol/l}$ Ankerstrang	33
20	Vorbereitung zur Sterilisierung	35
21	Belegung mit GS vs. Zeit-steril, 0,8 $\mu\text{mol/l}$ AS	35
22	Modell Spacer	36
23	Modell sequentielle Adsorption	42
24	Quantifizierung von Ankerstrang	IX
25	Kinetik der Ankerstrangbelegung	IX
26	Kinetik von Ankerstrang und 1,2 $\mu\text{mol/l}$ Spacerkonzentration	X
27	Kinetik von Ankerstrang und 0,2 $\mu\text{mol/l}$ Spacerkonzentration	X
28	Kinetik von GS bei sequentieller Adsorption mit 0,2 $\mu\text{mol/l}$ Spacer- konzentration	XI
29	Kinetik von Hybrid bei sequentieller Adsorption mit 1,2 $\mu\text{mol/l}$ Spacer- konzentration	XI

Tabellenverzeichnis

1	Chemikalien	9
2	Arbeitslösungen und Puffer	10
3	DNS-Sequenzen	11

Abkürzungsverzeichnis

AES	Augerelektronenspektroskopie
AFM	Atomic Force Microscopy, Atomkraftmikroskopie
AS	Ankerstrang
BMP	Bone Morphogenetic Protein, Morphogenetische Knochenproteine
c.p.	commercially pure, kommerziell rein
DNS	Desoxyribonukleinsäure, engl. DNA
dsDNS	double stranded DNS, doppelsträngige DNS
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
GS	Gegenstrang/komplementärer Strang
HE	Hybridisierungseffizienz
IEP	Isoelektrischer Punkt
MCH	Mercaptohexanol
Mg	Magnesium
NaAc	Natriumacetat
OEG	Oligoethylenglycol
ODN	Oligodesoxyribonukleotid
PAL	Protein Adsorption Layer, Proteinadsorptionsschicht
SAM	self-assembled monolayer, dt. selbstorganisierende Monoschicht
ssDNS	single stranded DNS, einzelsträngige DNS
XPS	X-ray photoelectron spectroscopy, Röntgenphotoelektronenspektroskopie

1 Einleitung

Ziel eines Knochenimplantates ist die feste und langzeitstabile Integration des eingebrachten Materials in das Knochengewebe. Die Osteointegration beschreibt dabei den Prozess der Verankerung eines Biomaterials in Knochen. Das Material steht dabei in engem Kontakt zum natürlichen, lebenden Knochengewebe und kann funktionell belastet werden (Larsson et al. (2001)). Um die notwendige Stabilität zu erlangen, ist eine ausreichende Mineralisierung des zu überbrückenden Zwischenraumes notwendig. Mikrobewegungen während der initialen Einheilung führen zu einer Einkapselung durch fibröses Gewebe und verhindern damit oftmals die funktionelle Integrität des Implantates. Frühzeitige Implantatrevisionen treten vor allem bei Patientengruppen mit bestimmten Risikofaktoren auf. Dazu gehören systemische Krankheiten, wie Osteoporose und Diabetes, vorherige Strahlenbehandlungen oder das Rauchen. Weitere Ursachen für ein Implantatversagen sind Störungen der Vaskularisierung oder zu geringe Knochenmasse aufgrund eines Ungleichgewichtes im Knochen-Remodeling (Michael et al. (2006); v. Steenberghe et al. (2003); Beutner et al. (2010)).

Durch das zunehmende Lebensalter der Bevölkerung ist es notwendig, dass auch Implantatmaterialien über längere Einsatzzeiten ohne Probleme im Knochengewebe integriert sind.

Wegen ihrem hervorragenden Korrosionsverhalten und den günstigen mechanischen Eigenschaften werden Titan-basierte Materialien häufig als Werkstoff für medizinische Implantate gewählt. Da das biologische System in direktem Kontakt zur Oxidschicht steht, sind die physiko-chemischen Eigenschaften dieser Schicht von besonderer Bedeutung (Scharnweber et al. (2002); Textor et al. (2001)). Im Folgenden werden die für das hier behandelte Immobilisierungssystem relevanten Eigenschaften der Luftpassivschichten von Reintitan und die Vorgänge bei der Formierung anodischer Oxidschichten beschrieben.

1.1 Eigenschaften von Luftpassivschichten

In sauerstoffhaltiger Umgebung bilden sich auf Titanbasislegierungen spontan Luftpassivschichten. Durch Röntgenphotoelektronen- und Augerelektronenspektroskopie-Analysen (XPS,AES) konnte gezeigt werden, dass die Luftpassivschicht hauptsächlich aus Titandioxid besteht, wobei auch Sauerstoffdefekte in der Größenordnung von $10^{20}/\text{cm}$ auftreten (Lausmaa et al. (1990)). Damit lässt sich die allgemeine Struk-

turformel mit TiO_{2-n} angeben. Die Luftpassivschicht besitzt n-halbleitende Eigenschaften mit einer strukturabhängigen Bandlücke von 3,0 bis 3,2 eV (Beutner (2011); Scharnweber et al. (2002)). Die Sauerstoffdefekte ermöglichen eine verstärkte Elektronenleitfähigkeit. Wie im folgenden Abschnitt gezeigt wird, hat das Auswirkungen auf die Bildung anodischer Oxidschichten.

Verschiedene Quellen berichten von einer partiell hydroxylierten Oberfläche der Luftpassivschicht (Boehm and Herrmann (1967)). Dabei sind bereits Konzentrationen von Hydroxylgruppen von $9,6 - 12 \text{ /nm}^2$ mittels XPS-Analysen nachgewiesen worden (McCafferty and Wightman (1998)). Protonen können durch Kationen und Hydroxyl-Ionen durch Anionen ausgetauscht werden (Hiemstra and Riemsdijk (1996)). Damit besitzt die Oxidschicht einen amphoteren Charakter. Die Ladungsverhältnisse an der Oberfläche werden vom pH-Wert und der Elektrolytkonzentration beeinflusst (Beutner (2011)). Der isoelektrische Punkt (IEP) ist der pH-Wert, bei dem sich die Oberfläche elektrisch neutral verhält. Die Oberfläche ist für pH-Werte unter dem IEP positiv, für pH-Werte über dem IEP negativ geladen. Für Luftpassivschichten von Reintitan wurde ein IEP von $4,5 \pm 0,1$ ermittelt (Rößler et al. (2002)).

1.2 Bildung anodischer Oxidschichten

Durch anodische Polarisierung in wässrigen Elektrolyten können die nativen Oxidschichten verdickt werden. Die Eigenschaften anodischer Oxidschichten sind mit denen der Luftpassivschichten vergleichbar. Durch die n-leitenden Eigenschaften der Oxidschicht erfolgt der Ladungstransport über Migration von Titan-Ionen in Richtung Grenzfläche Metall/Oxid und über Sauerstoff-Ionen aus dem Elektrolyten, die durch die Hydrolyse von Wasser generiert wurden, in Richtung Grenzfläche Oxid/Elektrolyt. Es kommt zu einem Wachstum an beiden Grenzflächen ((Beutner, 2011), (Scharnweber et al., 2002)). An der Grenzfläche Metall/Oxid entsteht in einer Festphasenreaktion eine kompakte Sperrschicht. An der Grenzfläche Oxid/Elektrolyt erfolgt die Schichtbildung über eine mehrstufige Hydrolyse von Titanionen. Parallel zur Oxidschichtverdickung führt die inhärente Elektronenleitfähigkeit zu einer Sauerstoffentwicklung an der Grenzfläche Oxid/Elektrolyt, bei deren Zwischenschritten reaktive Sauerstoffspezies entstehen. Die Vorgänge an der Grenzfläche Oxid/Elektrolyt führen zur Entstehung einer porösen äußeren Oxidschicht ((Aladjem, 1973), (Kunze et al., 2005), (Vanhumbeeck and J.Proost, 2009)). Generell wird das Oxidschichtwachstum durch die Hochfeldtheorie beschrieben, nach der die Schichtdicke linear vom Potential abhängig ist. Das Wachstum wird mit ca. 2

nm/V angegeben (Khalil and Leach (1986)). Für das untersuchte Immobilisierungssystem ist das Wachstum an der Grenzfläche Oxid/Elektrolyt entscheidend. Unter den hier verwendeten Bedingungen kann man von einem Schichtwachstum an dieser Grenzfläche von ca. 1 nm/V ausgehen.

1.3 Implantate in Gewebekontakt - Einfluss von Oberflächenmodifizierungen

Sofort nach Einbringung des Implantates in den Organismus kommt es zur Belegung der Implantatoberfläche mit Wasser und Ionen, worauf eine unspezifische Adsorption von Plasmaproteinen erfolgt. Diese Proteinadsorptionsschicht (PAL) gilt als Schlüsselement zwischen der Materialoberfläche und dem biologischen System. Da Zellen über die PAL in Kontakt mit dem Implantat treten, besitzt die PAL einen entscheidenden Einfluss auf die Verträglichkeit des Biosystems auf das Implantat. Die Anordnung und Zusammensetzung der Proteine dieser Schicht wiederum hängen von Interaktionen der Proteine mit der Implantatoberfläche ab. Dabei spielen energetische Interaktionen, elektrische Ladungen oder Interaktionen von Ionen und PAL durch Abbau- und Korrosionsprozesse eine Rolle. Je nach Substrat, Umgebungsgewebe und anderen Faktoren kommen diese Interaktionen verschieden schwer zum Tragen (Scharnweber et al. (2009); Beutner (2011); Tengvall (2001)) und beeinflussen die Proteine in ihrem Adsorptionsverhalten und in ihrer Konformation. Adhärierende Zellen werden von der teilweise denaturierten PAL beeinflusst und ändern ihr Adhäsions-, Proliferations- oder Differentationsverhalten und damit die aktive Remodellierung der Extrazellulären Matrix (EZM) (Beutner et al. (2010); Thevenot et al. (2008)).

Eine generelle Charakterisierung von Proteinen der PAL ist schwer zu realisieren, da mit der Vorbehandlung der Proben, verschiedenen Titanlegierungen und verschiedenen experimentellen Ansätzen eine Vielfalt an möglichen Proteinen anlagern kann. Mittels *in vitro* Experimenten fand man an Titanoberflächen beispielsweise Serumalbumin, Fibrinogen, Fibronectin oder Immunglobulin G. Da diese Proteine als Rezeptoren fungieren, kann man an ihnen ableiten, welche Zellen an die PAL adhärieren (Tengvall (2001)).

1.4 Oberflächenmodifizierungen für Implanatate in Knochenkontakt

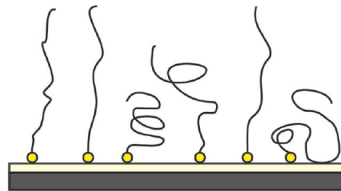
Aus den oben genannten Tatsachen (Abschnitt 1.3) ergeben sich drei Bedürfnisse an Oberflächenmodifizierungen: einerseits die Verhinderung unspezifischer Adsorption sowie Denaturierung von Proteinen, andererseits die Anziehung von gewebspezifischen Zellen oder Progenitorzellen, welche sich dem Gewebe entsprechend differenzieren und zuletzt die Induktion von Heilungsprozessen durch das Aussenden biochemischer Signale (Beutner et al. (2010)).

Durch Techniken wie bspw. Sandstrahlung, Säureätzung oder Deposition von Kalziumphosphat kann eine Titanoberfläche morphologisch und chemisch modifiziert und das Adsorptionsverhalten von Proteinen beeinflusst werden. Um die Zelladhäsion spezifisch zu beeinflussen, werden bioaktive Moleküle an der Oberfläche immobilisiert. Dazu existieren einige etablierte Methoden wie die Adsorption von Molekülen an der Oberfläche oder eine kovalente Kopplung. Eine adsorptive Immobilisierung von Proteinen ist jedoch mit schwachen Wechselwirkungen verbunden und hat eine zu schnelle Freisetzung der Komponenten zur Folge. Zudem können Peptide und Proteine zum Teil Konformationsänderungen eingehen und ihre Aktivität verlieren oder ändern, sodass es zu unerwünschten Zell- und Gewebereaktionen kommt. Eine kovalente Ankopplung bringt zusätzliche chemische Modifikationen der Oberflächen oder der bioaktiven Moleküle mit sich. Vor Verwendung dieses Systems muss gewährleistet sein, dass die Biomoleküle nicht beschädigt und *in vivo* keine toxischen Reaktionen ausgelöst werden. Beide Techniken besitzen den Nachteil nur geringe Mengen immobilisieren zu können. Zur Lösung der genannten Nachteile wurde ein modulares System entwickelt, welches die Doppelstrangbindung von DNS als Immobilisierungsprinzip für Oligodesoxyribonukleotide nutzt (Beutner et al. (2009)).

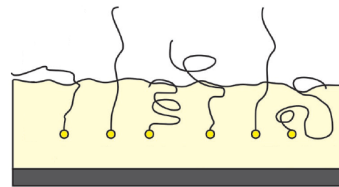
1.5 Immobilisierung von bioaktiven Molekülen mittels Oligodesoxyribonukleotid-System

Dieses System verwendet Oligonukleotidstränge (ODN) als Anker-moleküle und baut diese regioselektiv in die anodisch verdickte Oxidschicht ein. Im weiteren Verlauf werden komplementäre Oligonukleotidsequenzen (Gegenstränge, GS) mit den Hybridisierungssequenzen der immobilisierten Ankersträngen (AS) hybridisiert und *in vivo* freigesetzt. Im Folgenden wird der prinzipielle Prozess der Biofunktionalisierung der Oberfläche beschrieben und mittels Abbildung 1 verdeutlicht.

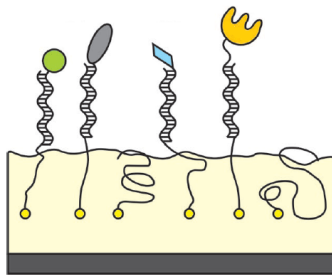
1. Die zu verankernden Moleküle werden auf die Titanproben aufgebracht. Über eine 5'-Phosphatgruppe erfolgt die Adsorption der Moleküle an die spontan gebildete Luftpassivschicht (Abb. 1(a)).
2. Im nächsten Schritt wird eine anodische Polarisierung durchgeführt. Durch die Verdickung der Oxidschicht während der anodischen Polarisierung werden die zuvor adsorbierten Moleküle nun an der Oberfläche fixiert (Abb. 1(b)). Es können verschiedene Arten des Einbaus eintreten. Dabei sollten die AS intakt bleiben, d.h. die Hybridisierungssequenz darf nicht in die Oberfläche eingebaut werden. Es besteht die Möglichkeit einer Interaktion des Phosphatrückgrates mit der Materialoberfläche.
3. Nach dem Einbau der Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Sequenz in die Oxidschicht sollte eine Sterilisierung erfolgen, um eine Abtötung pathogener Keime zu gewährleisten.
4. Es erfolgt eine Hybridisierungsreaktion (Abb. 1(c)), wobei eine Watson-Crick-Basenpaarung komplementärer Gegenstränge stattfindet. Den komplementären Strängen kommen aufgrund ihrer Konjugation mit funktionellen Biomolekülen spezielle Eigenschaften zu. Als Biomoleküle können Proteine (z.B. Wachstumsfaktoren, RGD-Peptide), Medikamente (Antibiotika oder Antiinflammatorika) oder funktionelle Nukleinsäuren eingesetzt werden.
5. Nach der Einbringung des funktionalisierten Implantats in den Organismus können die Biomoleküle freigesetzt werden oder als Rezeptoren zur Anlagerung von Osteoblasten dienen (Abb. 1(d)). Das Gewebe kann direkt mit dem Wirkstoff interagieren oder indirekt nach der Freisetzung des Wirkstoffes reagieren.



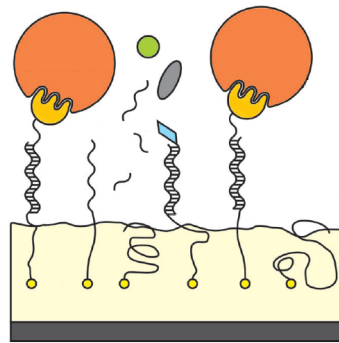
(a) Schritt 1: 5'-terminale Phosphatgruppen (gelb) ermöglichen den einzelsträngigen Ankermolekülen die Adsorption an die Luftpassivschicht der Titanoberfläche.



(b) Schritt 2: Durch die anodische Polarisierung wurde die native Luftpassivschicht verdickt. Die AS wurden partiell in die Oxidschicht eingebaut.



(c) Schritt 4: Hybridisierung der fixierten AS mit komplementärer ss-DNS (GS) und konjugierten Biomolekülen.



(d) Schritt 5: Die Osseointegration wird gefördert, indem bioaktive Moleküle, wie Wachstumsfaktoren oder Medikamente, freigesetzt werden, oder Osteoblasten (orange) an Rezeptormoleküle (gelb) binden.

Abbildung 1: Modell des ODN-basierten Immobilisierungssystems. Modifiziert nach Michael et al. (2009).

2 Zielstellung

In Vorarbeiten zum Thema der Immobilisierung von AS an Titanoberflächen wurde die zusätzliche Immobilisierung von kurzen, einzelsträngigen DNS-Sequenzen (Spacer) untersucht. Diese sollten als Abstandshalter zwischen den Ankersträngen dienen, sodass die Hybridisierungsbereiche der AS für eine Hybridisierung mit Gegensträngen frei liegen und eine optimale Hybridisierung erfolgen kann. Dabei konnte kein Effekt der Spacer auf die Hybridisierbarkeit der Ankerstränge festgestellt werden. In folgendem Diagramm ist erkennbar, dass bei gleichen Konzentrationen die immobilisierte Menge an AS abnimmt, wenn die Immobilisierung mit zunehmender Menge an Spacermolekülen durchgeführt wird (Abb. 2). Aufgrund der geringen Verdrängung der AS war daher zu vermuten, dass sich der Spacer tatsächlich auf der Oberfläche befindet und die AS räumlich voneinander trennt. In anschließenden Hybridisierungsexperimenten konnte zudem festgestellt werden, dass die sich Menge an gebildetem Hybrid nicht von ko-immobilisiertem Spacer beeinflussen lässt. Die Hybridisierungseffizienz wird als das prozentuale Verhältnis der Belegungsdichten von Gegenstrang und Ankerstrang definiert. Bei verschiedenen Konzentrationen an AS mit variierender Spacerkonzentration unterscheiden sich die Hybridisierungseffizienzen nicht (Abb. 2).

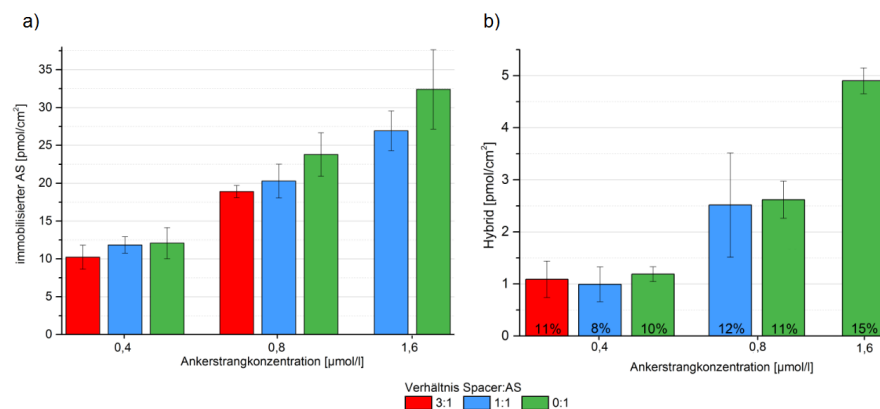


Abbildung 2: Immobilisierung und Hybridisierung. Verschiedene Spacerkonzentrationen wurden mit den AS-Konzentrationen 0,4 μmol/l, 0,8 μmol/l und 1,6 μmol/l zur Immobilisierung kombiniert und die Ankerstrangmenge auf der Probe festgestellt (a). Dazu wurden Hybridisierungsexperimente durchgeführt (b). Die Hybridisierungseffizienz ist für jedes Hybrid angegeben.

Schlussfolgernd konnte festgestellt werden, dass die Oberflächendichte zwar durch den Spacer erhöht wurde, die AS aber keine erhöhte Hybridisierungsfähigkeit gezeigt haben. In Desorptionsuntersuchungen konnte ebenfalls nicht festgestellt werden, dass ein Spacer zu stabilen Hybriden führt. Durch die Quantifizierung der

Spacermenge sollen in folgenden Experimenten Aussagen über das Adsorptions- und das Desorptionsverhalten der Spacer gewonnen werden. Dazu werden bereits untersuchte Oberflächenzustände erneut hergestellt und untersucht. Außerdem bietet es sich an, andere Methoden des Adsorptionsvorganges zu untersuchen. Damit soll festgestellt werden können, ob eine Verdrängung der kurzen Spacerstränge durch längere Ankerstränge erfolgt. Durch Hybridisierungsexperimente soll anschließend eine Aussage über die Stabilität und die Hybridisierungseffizienz gebundener Gegenstränge erlangt werden. Ein weiterer Schritt zur Optimierung des DNS-basierten Immobilisierungssystems liegt in der Variation des Freisetzungsverhaltens der GS mit den jeweiligen aktiven Molekülen. In Hybridisierungsexperimenten sollen daher verschiedene GS untersucht werden, um die gebildeten Hybride hinsichtlich ihrer absoluten Menge auf der Titanoberfläche und die freigesetzten GS zu charakterisieren. Bei der Auswahl an Gegensträngen können Faktoren wie die GS-Länge, die Anzahl der komplementären Basen und die Basenzusammensetzung eine Rolle spielen. Zudem sollen verschiedene Hybridisierungsbedingungen realisiert werden, um deren Einfluss auf die Hybridbildung sowie die Freisetzung von GS zu untersuchen. Mit der Kontrolle der Stabilität von Hybriden könnte zukünftig ein regulierbares Freisetzungssystem *in vivo* ermöglicht werden. Für eine Anwendung des Immobilisierungssystems in der Praxis ist der Vorgang der Sterilisierung notwendig. Dieser hat jedoch eine teilweise Schädigung des AS zur Folge. Um diese zu minimieren, sollen Experimente mit verschiedenen vorbehandelten Proben durchgeführt werden. Durch die Beschichtung von Implantatoberflächen mit bioaktiven Molekülen sollen zukünftig zellspezifische Reaktionen hervorgerufen werden können. Somit kann der Einbau des Knochenimplantates in das natürliche Gewebe induziert werden. Mit der Auswahl an möglichen Biomolekülen soll weiterhin eine patientenspezifische Beschichtung ermöglicht werden, um die Chancen der Integration des Implantates zu verbessern.

3 Materialien

3.1 Chemikalien

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und deren Herkunft.

Chemikalien	Herkunft/Firma
Agarose, Typ 1	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Essigsäure	VWR, Darmstadt
Ethanol (EtOH)	VWR, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumacetat (NaAc)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe

3.2 Arbeitslösungen und Puffer

Tabelle 2: Verwendete Arbeitslösungen und Puffer. Alle Lösungen wurden vor Verwendung autoklaviert.

Arbeitslösung/Puffer	Zusammensetzung
Agarosegel für Stromschlüssel	2% w/v Agarose in 2 M Natriumacetat (NaAc)-Puffer lösen (200°C) Pumpschlauch mit Agarose befüllen Abkühlung des Schlauches in H ₂ O Aufbewahrung in 2 M NaAc-Puffer
Elektrolytlösung	0,5 M NaAc-Puffer 5 M Ethanol (EtOH) pH 4,0
Hybridisierungs-Puffer, 10x	1,54 mol/l NaCl 0,017 mol/l KH ₂ PO ₄ 0,05 mol/l Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O in entionisiertem H ₂ O lösen mit 2 M NaOH pH 6,85 einstellen
Desorptions-Puffer	1x PBS verdünnt mit entionisiertem H ₂ O
NaAc-Lösung, 2 M	200 ml 2 M Essigsäure vorlegen mit 2 M NaAc-Lösung pH 3,5 einstellen
PBS, 10x	1,369 mol/l NaCl 26,83 mmol/l KCl 101,41 mmol/l Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O 17,63 mmol/l KH ₂ PO ₄ in entionisiertem H ₂ O lösen pH 7,4
PBS kaliumfrei, 10x	1,4 mol/l NaCl 0,1 mol/l Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O 0,018 mol/l NaH ₂ PO ₄ in entionisiertem H ₂ O lösen pH 7,37

3.3 Untersuchungsmaterial

Die untersuchten Probenscheiben aus Reintitan (commercially pure, c.p.) wurden von der Firma KLS Martin in Tuttlingen, Baden-Württemberg, hergestellt. Die sandgestrahlten Rundkörper besaßen einen Durchmesser von 14,7 mm und waren 2 mm dick. Beschichtet wurde eine Oberfläche von 1,13 cm².

Die für die Versuche verwendeten DNS-Einzelstränge sind in folgender Tabelle aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete DNS-Stränge und deren Sequenzen.

Nomenklatur	Sequenzabfolge	Länge
AS	5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA CCAAACCCGTCATCAAGTCTACACTGTTC-3'	60 mer
Spacer	5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3'	30 mer
GS ₂₅ (GS)	3'-TTTGGGCAGTTAGTTCAGATGTGAC-5'	25 mer
GS ₂₀ (GS)	3'-GCAGTTAGTTCAGATGTGAC-5'	20 mer
GS _{25/3F} (GS)	3'-TTTCGGCTGTTTGTTCAGATGTGAC-5'	25 mer
GS _{25/nk} (GS)	3'-TGCTGGAGGATTATTGTTGATACCG-5'	25 mer

Die Auswahl Nukleinsäuren erfolgte durch die Arbeitsgruppe Dr. B. Schwenzer der Professur für Allgemeine Biochemie der TU Dresden. Ein GC-Gehalt von mindestens 40% dient der thermodynamischen Stabilität von DNS. Unter Benutzung des Web Servers mfold (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>) wurde kontrolliert, dass die Anker- oder Gegenstränge untereinander keine stabilen Hybride formen oder sich in internen Loops anordnen.

Der AS wurde mit einer initialen Poly-Adenin-Sequenz von 30 Nukleotiden versehen (Spacersequenz). Die Hybridisierungssequenz des AS ist 25 Nukleotide lang. Weiterhin ist der AS am 3'-Terminus mit einem Überhang von drei Basen versehen. Der Spacer-Strang hat analog zur Poly-A-Sequenz des AS eine Länge von 30 Nukleotiden. AS und Spacer wurden mit 5'-terminalen Phosphatgruppen versehen.

Um die Menge an immobilisierten AS und Spacer und hybridisierten GS zu quantifizieren, wurden radioaktive Markierungen mit dem Nuklid ³²P eingesetzt. Die ³²P-Markierung der AS und Spacer erfolgte am 5'-Ende. Dazu wurde der 5'-Terminus des unphosphorylierten Vorläuferstranges unter Einsatz der T4-Kinase mit einem γ -³²P-dATP markiert (Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Niedersachsen). Die Gegenstränge wurden am 3'-Ende markiert. Dazu wurden die ODNs bis auf das letzte Nukleotid am 3'-Terminus synthetisiert (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Baden-Württemberg). Anschließend wurden diese Vorläuferstränge mit einem radioaktiven Nukleotid verlängert (Hartmann Analytic GmbH). Die Verlängerung um das α -³²P-dCTP wurde mittels terminaler Transferase durchgeführt. Die folgende Abbildung zeigt das Prinzip der Markierung.

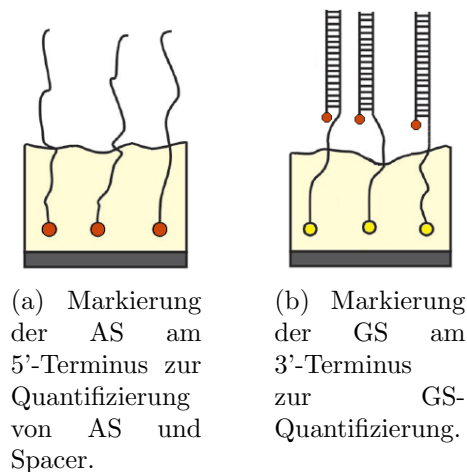


Abbildung 3: Markierungsvarianten für die Quantifizierung der AS und der hybridisierten GS.

Die gefriergetrockneten Ankerstränge von Thermo Fisher Scientific wurden mit sterilisiertem, entionisiertem Wasser auf Konzentrationen von $50 \mu\text{mol/l}$ eingestellt und in Aliquots bei -20°C gelagert.

Aus den radioaktiv markierten Lösungen von Hartmann Analytic GmbH wurden mit sterilisiertem, entionisiertem Wasser, Lösungen mit einer Aktivität von 1 MBq/ml hergestellt und in Aliquots bei -20°C gelagert.

Aufgrund der Halbwertszeit von $14,27 \text{ d}$ von ^{32}P wurden die Lösungen zeitnah für die Versuche bestellt und verwendet. Die Ankerstrang- und Spacerlösungen wurden prinzipiell wie folgt hergestellt.

- Spacer- oder Ankerstranglösung je nach Gebrauchskonzentration,
- $0,48 \mu\text{mol/l}$ NaAc,
- $4,84 \mu\text{mol/l}$ EtOH,
- mit enionisiertem H_2O auffüllen.

Wenn mit radioaktiv markierten Spacer- oder Ankerstranglösungen gearbeitet wurde, wurden $50 \mu\text{l}$ der markierten Lösung mit einer Aktivität von 1 MBq/ml der Gebrauchslösung hinzugefügt und dieses Volumen vom Wasser abgezogen. Der Stoffmengenanteil der radioaktiven Lösung betrug dabei $0,02\text{-}0,4\%$.

Die $0,8 \mu\text{mol/l}$ Gegenstrang-Lösung wurde prinzipiell wie folgt hergestellt.

- $4 \mu\text{mol/l}$ GS-Lösung, Mischung aus radioaktiv markierter und nicht radioaktiv markierter Stoffmenge,

- 10% 10x Hybridisierungs-Puffer,
- mit enionisiertem H₂O auffüllen.

3.4 Geräte

Elektrochemiezelle (Abbildung 4)

- Gehäuse der Kammer aus Polyetherimid (PEI)
- Kammerboden aus Reintitan
- Dichtungsringe aus Ethylen-Propylen-Dien-Kautschuk (EPDM)
- Drei-Elektroden-Aufbau, Gegenelektroden aus Golddraht

Potentiostat/Galvanostat

- VoltaLab PGZ301 Dynamic-EIS Voltammetry und HVB100 High Voltage Booster (Radiometer, Kopenhagen, Dänemark)
Software: VoltaMaster 4, Version 5.6
- VMP3B-5 (Bio-Logic Science Instruments, Grenoble, Frankreich),
Software: EC-Lab VMP3

Kontamat

- Kontamat FHT 111 M (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
Xenon-Zählrohr

Rasterlektronenmikroskop

- DSM 982 Gemini, Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)

Sputter Station

- MED 010, Balzers (Balzers, Liechtenstein)

4 Methoden

4.1 Vorbereitung der Titanoberfläche

Die sandgestrahlten Titanproben wurden ca. 2 h vor dem Einsatz für fünf Minuten mit einer Heißätzung von 108°C in HCl und H₂SO₄ behandelt. Die Ätzlösung bestand aus 5,1 M HCl und 4,6 M H₂SO₄. Eine anschließende Reinigung für 2 x 15 Minuten in sterilen, entionisiertem Wasser im Ultraschallbad sorgte für eine Entfernung von Säure- und Strahlgutresten. Bis zur Benutzung verblieben die Proben in sterilem Wasser, um sie möglichst kontaminationsfrei zu halten.

4.2 Oberflächenmodifizierung

Zur Vermeidung von Sekundärstrukturen wurde die DNS-Lösung für 2 min bei 95°C im Thermoblock denaturiert und anschließend 5 min auf Eis schockgekühlt. Die Titanproben wurden in der Elektrochemiekammer fixiert und je 300 µl der Ankerstranglösung aufpipettiert. Für Ankerstrang- und Spacerexperimente wurden die entsprechend konzentrierten, zusammengesetzten Lösungen verwendet. Da ein fotokatalytischer Effekt auf Titandioxid zum Abbau organischer Verbindungen führt, wurde die Kammer zur Vermeidung von Lichteinflüssen während des 15-minütigen Adsorptionsvorganges im Dunkeln gelagert. Anschließend erfolgte die anodische Polarisation. Hierbei wird ein Drei-Elektroden-Aufbau (Elektrochemiezelle, s. Abb. 4), bestehend aus einer Titan-Anode, einer Platin- oder Gold-Kathode und einer Ag/AgCl-Referenzelektrode, genutzt. Auf eine bestmögliche Lichtabschirmung wurde auch dabei Wert gelegt. Die Gegenelektrode wurde an der Kammer angebracht. Mittels Stromschlüssel wurde eine Verbindung zur AgCl-Referenzelektrode erstellt und die Arbeitselektrode wurde angeschlossen. Anschließend wurden 6 ml der Elektrolytlösung in die Kammer gegeben und der Polarisationsprozess gestartet. Das Abschaltpotential wurde auf 7,5 V_{Ag/AgCl} und die Stromstärke auf 45-47 mA chronoamperometrisch eingestellt. Dadurch wurde eine Stromdichte von 13,4 mA/cm² erreicht. Die anodische Polarisation dauerte 2-3 s. Nach diesem Schritt wurde die Elektrolytflüssigkeit abgenommen und die Elektrochemiezelle auseinandergebaut. Die beschichteten Probenstücke wurden mit der Pinzette entnommen und ca. 3 s in entionisiertem Wasser gespült. Hierbei wurden nicht immobilisierte Moleküle und Reste der Elektrolytlösung von der Oberfläche gewaschen. Später wurden die Proben in Multiwellplatten überführt. Probenstücke, welche ausschließlich für Im-

mobilisierungsuntersuchungen genutzt wurden, besaßen eine radioaktive Markierung und wurden in 3 ml Desorptions-Puffer bei 37°C gelagert. Probenstücke, welche für Hybridisierungsversuche genutzt werden sollten, wurden bei RT im Dunkeln trocken gelagert.

Für Versuche mit sequentieller Adsorption wurden zuerst 300 μ l der Spacerstranglösung auf die Proben pipettiert. Nach 15-minütiger Adsorptionszeit wurde die Spacer-Lösung abgenommen und 300 μ l der AS-Lösung aufpipettiert. Nach einer Adsorptionszeit von 15 min wurde der Vorgang der elektrochemische Polarisationsprozess gestartet.

Versuche mit verlängerten Adsorptionszeiten wurden prinzipiell wie oben beschrieben durchgeführt. Die Adsorptionszeit variierte dabei jedoch zwischen 5 min, 15 min, 30 min, 60 min und 19,5 h.

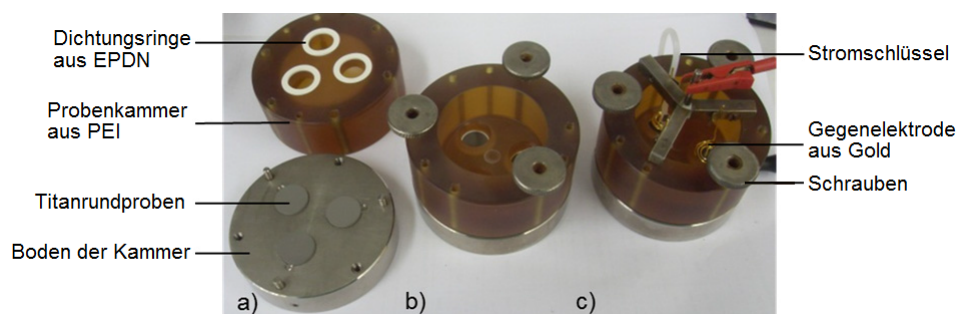


Abbildung 4: Aufbau der Elektrochemiezelle. a) Position der Titanproben auf dem Zellenboden sowie Probenkammer mit Dichtungsringen. b) zusammengesetzte Zelle und c) Elektrochemiezelle mit eingesetztem Agarose-Stromschlüssel und Gegenelektrode.

4.3 Sterilisierung

Um die getrockneten Probenstücke für eine γ -Sterilisierung vorzubereiten, wurden die Probenstücke in Multiwellplatten für 2 d in einem Exsikkator über P_2O_5 und unter Lichtausschluss gelagert. In einem Glovebag wurden die Probenstücke aus dem Exsikkator und den Wellplatten entnommen, 2 bis 3 mal mit Argon gespült, unter Argon-Atmosphäre in lichtundurchlässige, aluminiumbeschichtete Sterilisierungspackungen gebracht und verschweißt. Die γ -Sterilisierung erfolgte bei der Gamma-Service Produktbestrahlung GmbH, einem Unternehmen der Synergy-Health-Gruppe in Radeberg, Sachsen, bei mindestens 25 kGy.

4.4 Hybridisierung

100 μl 10x PBS wurden auf die Titanproben pipettiert. Dies sollte die Proben unter physiologische Bedingungen versetzen und an der Oberfläche immobilisierte Ankerstränge in eine aktive Position, das heißt empfänglich für Gegenstränge, bringen. Es war darauf zu achten, dass die Lösung mittig auf die Probenstücke aufgebracht wurde, sodass ein Herunterlaufen der Flüssigkeit verhindert wurde. Nach 20 min wurde der Puffer mit einer Pipette möglichst vollständig wieder aufgenommen und verworfen. Die Gegenstranglösungen wurden vor Verwendung für 2 min auf dem Thermoblock bei 95°C erhitzt und anschließend für 5 min auf Eis abgekühlt. 50 μl der 0,8 $\mu\text{mol/l}$ Hybridisierungslösung wurden auf das Titanplättchen pipettiert. Es erfolgte eine 60-minütige Inkubation der Probenstücke bei RT unter Lichtausschluss. Nach dieser Hybridisierungsphase wurden die Titankörper mit der Pinzette für ca. 2-3 s in sterilem Wasser gespült. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mit den noch feuchten Proben sofort nach dem Spülschritt. Anschließend wurden die Titanproben in eine 12-Wellplatte überführt und mit 3 ml 1x PBS-Puffer bei 37°C mit Parafilmabdeckung inkubiert.

Für die Experimente mit Variation der Hybridisierungsbedingungen wurden die 60-minütigen Hybridisationsvorgänge entweder bei höheren Temperaturen (37°C, 60°C) durchgeführt oder die GS-Lösungen mit einer Absolutkonzentration von 1 mmol/l MgCl_2 bzw. mit anderen Pufferlösungen (PBS, PBS ohne Kalium) anstelle des Hybridisierungs-Puffers angesetzt.

4.5 Quantifizierung der immobilisierten Stränge mittels radioaktiver Markierung

Die Hintergrundaktivitäten wurden durch die Messung nicht beschichteter Titanproben ermittelt. Durch Aktivitätsmessungen bekannter Volumina wurden Kalibrierstandards ermittelt. Da die emittierte β^- -Strahlung auf den Proben jedoch in alle Raumrichtungen weist, ist es unmöglich, die gesamte Strahlungsintensität zu erfassen. Damit die Intensitätsmessungen der Probenkörper jedoch vergleichbar sind, ist es sinnvoll, jede Probe auf die gleiche Art und Weise zu messen. Dazu wurde eine Vorrichtung konstruiert, die es ermöglichte, alle Probenstücke auf dieselbe Stelle unter dem Kontamat zu platzieren. Die Zählrate wurde nach 30 s ermittelt. In Desorptions-Puffer gelagerte Probenstücke wurden vor der Messung mit der Unterseite der Titanprobe auf einem Papiertuch abgetupft. Die Probenoberseite mit der darauf befindlichen DNS sollte während der Messung noch feucht sein.

4.6 Rasterelektronenmikroskopie

Die luftgetrockneten Proben wurden auf Objektträgern befestigt und am unteren Rand mit Leitsilber versehen. Die abschließende Bedampfung der Proben mit Graphit im Hochvakuum war notwendig, um bei einfallenden Elektronen eine Ableitung der Ladung zu gewährleisten und damit die Bildung statischer Potentiale zu vermeiden. Die rasterelektronischen Bilder wurden mit einer Beschleunigungsspannung von 3 kV und einem Arbeitsabstand von 8 mm aufgenommen. Dabei wurden je Probe vier Aufnahmen mit den Vergrößerungen 500x, 2000x, 5000x und 10000x hergestellt.

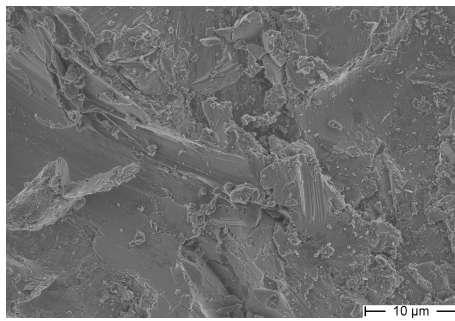
5 Ergebnisse

Die nachfolgend gezeigten Ergebnisse beruhen auf mehrfach durchgeführten Experimenten. Dabei können immer wieder selbe Trends beobachtet werden, wobei die Größenverhältnisse Schwankungen unterliegen. Die Anzahl der für die Darstellungen verwendeten Probenstücke ist für jede Abbildung angegeben.

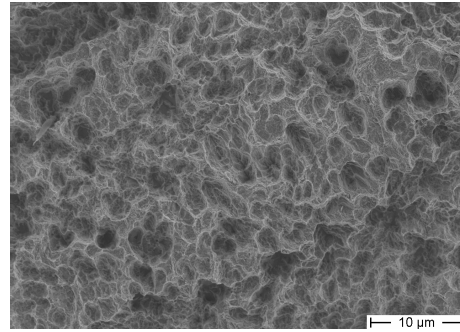
Nach der Abbildung der REM-Aufnahmen werden die Ergebnisse zur Immobilisierung des Ankerstranges mit Spacerzusatz dargestellt. Dabei werden AS und Spacer-Immobilisierungen quantifiziert und verschiedene Adsorptionsmethoden analysiert. Des Weiteren werden Ergebnisse der Hybridisierungsversuche dargestellt. Die Belagungsdichten der GS wurden quantifiziert, Variationen der Hybridisierungsprozesse sowie der Vorbereitungsprozesse auf die Sterilisierung wurden durchgeführt und die Kinetik der Belagungsdichte wurde betrachtet.

5.1 Rasterelektronenmikroskopie

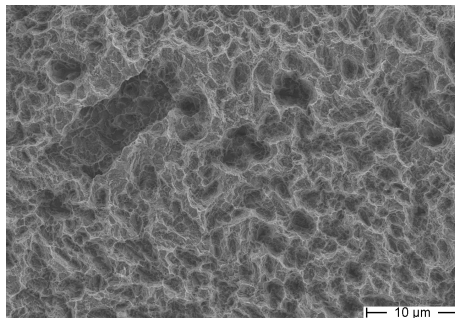
Abbildung 5(a) zeigt die c.p. Titan-Oberfläche nach der Oberflächenbehandlung mit Sandstrahlung. Deutlich zu erkennen ist eine ungleichmäßige, kantige Oberflächenstruktur. Die raue Oberfläche wird von kleineren (unter $10\text{ }\mu\text{m}$) und größeren ($10\text{--}20\text{ }\mu\text{m}$) Strahlgutresten auf der Oberfläche geprägt. Ansatzweise sind auch Unterschiede im Höhenprofil der Oberfläche abzuleiten. Abbildung 5(b) zeigt, aufgrund der chemischen Behandlung, eine gleichmäßig strukturierte Oberfläche. Kleine wellenförmige, porenähnliche Strukturen (ca. $2\text{ }\mu\text{m}$) bestimmen das Gesamtbild. Dunklere Stellen zeigen größere Tiefen an. So sind auch die beim Sandstrahlen entstandenen groben Unebenheiten noch erkennbar. Die verdickte Oxidschicht nach einer anodischen Polarisierung kann mittels Rasterelektronenmikroskopie nicht erkannt werden (Abb. 5(c)). Auch organische Komponenten, wie in die Oxidschicht eingebauten Oligonukleotide können, trotz hohen Konzentrationen ($1,6\text{ }\mu\text{mol/l}$), nicht mittels REM erkannt werden (Abb. 5(d)). Die Auflösung ist dafür zu gering. Zudem könnte die hochenergetische Beschleunigungsspannung die Biomoleküle zerstören.



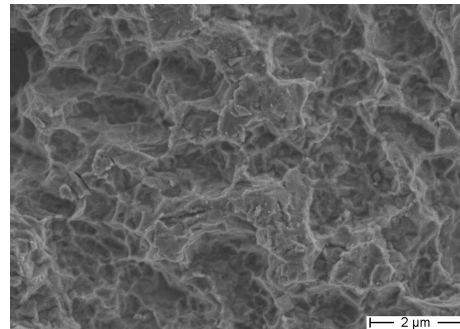
(a) Sandgestrahlte Titanoberfläche.



(b) Sandgestrahlte Titanoberfläche nach einer Säureätzung.



(c) Sandgestrahlte, geätzte und anodierte Titanoberfläche.



(d) Sandgestrahlte und geätzte Titanoberfläche mit ODN-Immobilisierung.

Abbildung 5: REM-Aufnahmen von den Titanproben. Beschleunigungsspannung: 3 kV; Arbeitsabstand: a), d) 7 mm und b), c) 8 mm; Vergrößerung: a), b), c) 2000x und d) 10000x. Heißätzung: 108°C und 5,1 mol/l HCl und 4,6 mol/l H₂SO₄; ODN-Immobilisierung: 1,6 µmol/l AS

5.2 Immobilisierung von Ankerstrang mit Zusatz von Spacer

5.2.1 Quantifizierung von Ankerstrang und Spacer

Um eine mit AS und Spacer beschichtete Oberfläche besser charakterisieren zu können, wurden Experimente zur Quantifizierung beider Stränge durchgeführt. Die Belegungsdichte wird als Verhältnis der molaren Menge an Oligonukleotid bezogen auf die geometrische Fläche der Probe definiert. Im folgenden Diagramm (Abb. 6) sind die auf der Titanprobe immobilisierten Mengen der Oligonukleotidstränge AS und Spacer bei verschiedenen zur Immobilisierung eingesetzten AS- und Spacerkonzentrationen gezeigt. Dabei wurden die Konzentrationen 0,4; 0,8; und 1,6 µmol/l an AS eingesetzt und mit der gleichen Konzentration oder einer dreifach so hohen Konzentration an Spacer für 15 min adsorbiert und immobilisiert. Gut zu erkennen ist, dass der Spacer, wenn er im Überschuss eingesetzt wurde, auch auf der Titanprobe überwiegend vorhanden ist. Jedoch entspricht das Mengenverhältnis zwischen

AS und Spacer nicht dem Konzentrationsverhältnis der Immobilisierungslösungen. Überraschend ist, dass bei gleichen Konzentrationen AS und Spacer, der AS in jedem Fall dominiert. Unabhängig von der eingesetzten Spacerkonzentration befindet sich immer eine ähnlich große Menge AS auf der Titanprobe.

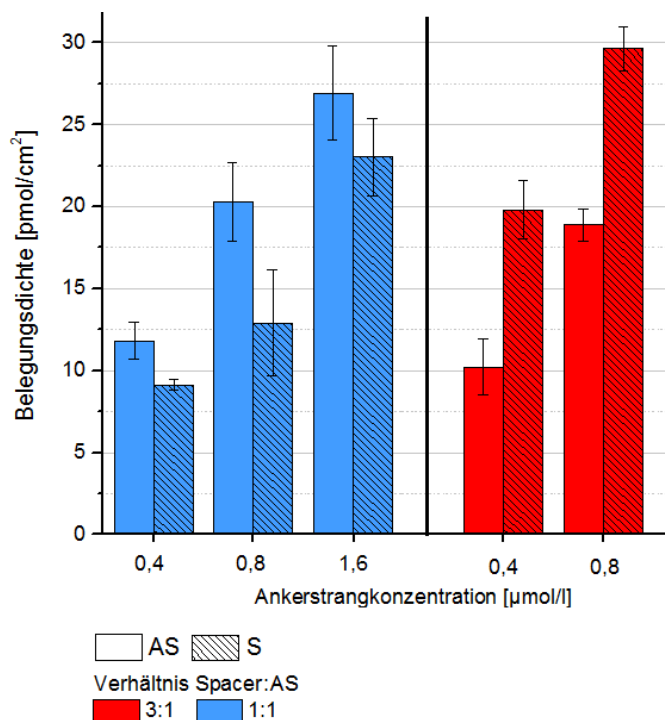


Abbildung 6: Belegungsdichte des Ankerstrangs und ko-immobilisierten Spacers. Vergleich von eingesetzten AS-Konzentrationen mit verschiedenem Spacer-Anteil auf der Titanoberfläche. (n=3)

In früheren Experimenten wurde die Belegungsdichte von AS in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration untersucht (Abb. 24). Dabei steigt die Belegungsdichte mit AS im Konzentrationsbereich von 0,2 bis 0,8 $\mu\text{mol/l}$ linear an. Im Konzentrationsschritt von 0,8 auf 1,6 $\mu\text{mol/l}$ fällt der Anstieg flacher aus.

Analog dazu zeigt Abbildung 7 die Belegungsdichte an fixiertem Spacer bei einer reinen Spacerimmobilisierung und steigender Konzentration. Die Oberflächenbelegung steigt zwischen 0,4 und 1,6 $\mu\text{mol/l}$ nahezu linear an. Im Konzentrationsschritt von 1,6 auf 2,4 $\mu\text{mol/l}$ ist kein so großer Anstieg wie zwischen der Konzentration von 0,8 auf 1,6 $\mu\text{mol/l}$ zu erkennen.

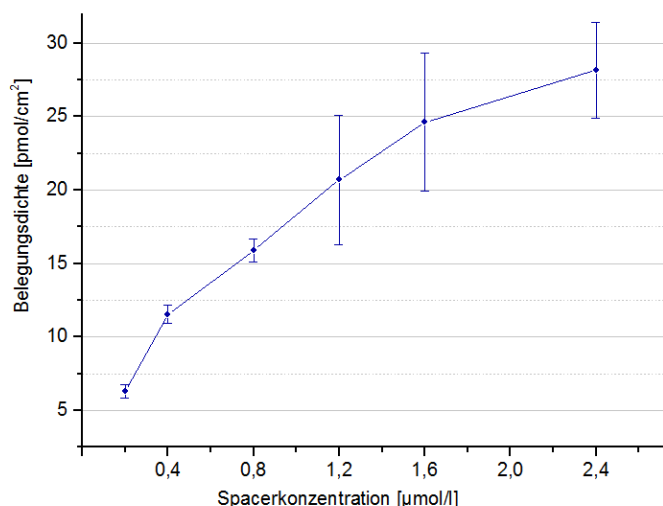


Abbildung 7: Quantifizierung von reinem Spacer bei verschiedenen Spacerkonzentrationen zur Immobilisierung. ($n=3$)

5.2.2 Adsorptionsmethoden bei Spacerzusatz

Um den Einfluss auf die Hybridisierungseffizienz von Gegensträngen bewerten zu können, wurden folgende Adsorptionsmethoden genutzt. Zum einen wurde die Dauer der gemeinsamen Adsorption von AS und S variiert. Außerdem wurde neben der gemeinsamen Adsorption von AS und Spacer die Probe zuerst mit Spacer belegt. Dabei wurde die Spacerlösung nach der Adsorptionszeit abgenommen und die AS-Lösung aufgebracht. Nach der AS-Adsorption wurde die anodische Polarisierung durchgeführt. Aufgrund zeitlicher und materieller Begrenzung konnten nur ausgewählte Oberflächenzustände untersucht werden. Da die Daten aus einer Versuchsreihe stammen, lassen sich diese gegenüberstellen. Für die Methoden der sequentiellen und simultanen Immobilisierung wurden sinnvolle Kombinationen zum Erreichen der Sättigung der Oberfläche eingesetzt. Die eingesetzten Mengen sind teilweise nicht direkt vergleichbar.

5.2.2.1 Adsorptionszeit bei simultaner Adsorption

Die nachfolgende Abbildung (Abb. 8) zeigt die Ergebnisse bei einer zeitlich variierenden Adsorptionsdauer bei simultaner Adsorption von AS und Spacer. Durchgeführt wurden Immobilisierungsvorgänge, bei welchen die Adsorptionszeiten 5 min, 15 min, 30 min, 60 min und 19,5 h betrugen. In allen Versuchen wurden $0,4 \mu\text{mol/l}$ AS und ein Verhältnis von AS zu Spacerstrang von 1:3 eingesetzt. Generell ließ sich bei einer Adsorptionszeit von 19,5 h im Vergleich zur Adsorption im Standard-Protokoll (15 min) eine Änderung der jeweils immobilisierten ODN-Mengen feststellen. Während

unter Nutzung des Standardprotokolls 7 pmol/cm^2 AS und 20 pmol/cm^2 Spacer immobilisiert wurden, konnte bei einer Adsorptionszeit von 19,5 h eine Steigerung der Menge auf 14 pmol/cm^2 AS und 31 pmol/cm^2 Spacer festgestellt werden. Nach einer Adsorptionsdauer von 5 min kann das eingesetzte Konzentrationsverhältnis von Spacer und AS auf das Verhältnis der Belegungsdichte beider Stränge übertragen werden, sodass viermal mehr Spacer als AS immobilisiert wurde. Nach 19,5 h ist dieses Verhältnis nicht nachzuweisen. Die Belegungsdichte von AS hat sich hier im Vergleich zur Belegungsdichte nach 5 min Adsorptionszeit mehr als verdoppelt. Die Belegungsdichte des Spacers ist auf das 1,5 fache gestiegen.

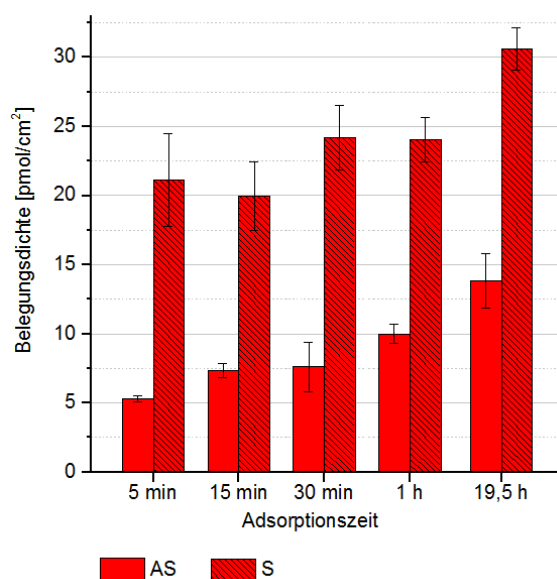


Abbildung 8: Variation der Adsorptionszeit. $0,4 \mu\text{mol/l}$ Ankerstrang und $1,2 \mu\text{mol/l}$ Spacer wurden nach verschiedenen Adsorptionszeiten immobilisiert. ($n=3$)

In Abbildung 9 ist die Desorptionskinetik der Belegungsdichte von immobilisierten AS und Spacer nach Variation der Adsorptionszeit (5 min und 19,5 h) bei Lagerung in Desorptions-Puffer und bei 37°C zu sehen. Deutlich erkennbar ist eine rund 70%ige Abnahme der Belegungsdichte beider immobilisierten Spacerstränge nach 1h Desorption. Die AS-Dichte nimmt in beiden Fällen nach 1h Desorption rund 50% ab. Im weiteren Verlauf der Zeit ist allgemein keine Abnahme der Belegungsdichte von AS und Spacer erkennbar.

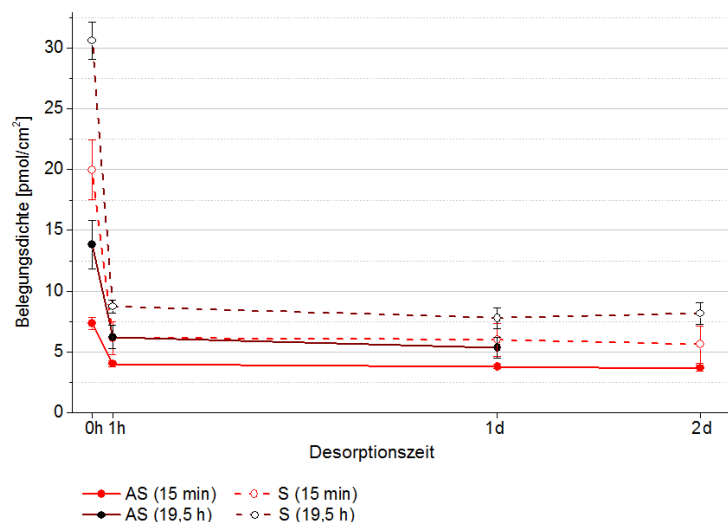


Abbildung 9: Kinetik von Ankerstrang und Spacer bei Variation der Adsorptionszeit. $0,4 \mu\text{mol/l}$ Ankerstrang und $1,2 \mu\text{mol/l}$ Spacer wurden nach verschiedenen simultanen Adsorptionszeiten (15 min, 19,5 h) immobilisiert. Lagerung bei 37°C in Desorptions-Puffer. ($n=3$)

5.2.2.2 Sequentielle Adsorption von Ankerstrang und Spacer

Um das Konkurrenzverhalten zwischen dem längeren AS und dem kürzeren Spacer um den Platz auf der Probe zu analysieren, wurden verschiedene Arten des Adsorptionsvorganges untersucht. In folgender Abbildung (Abb. 10) sind die Ergebnisse der Immobilisierung nach sequentieller Adsorption zu sehen. Es wurden Spacerkonzentrationen von jeweils $0,2$ und $1,2 \mu\text{mol/l}$ mit verschiedenen AS-Konzentrationen kombiniert. Festzustellen ist, dass bei den geringen Konzentrationen an Spacer und steigendem AS-Gehalt die Belegungsdichte an Spacer gleich bleibt (rund 5 pmol/cm^2). Der AS kann entsprechend seiner Konzentration an der Oberfläche adsorbieren und wird immobilisiert. Bei der Verdopplung der eingesetzten AS-Konzentration von $0,4$ auf $0,8 \mu\text{mol/l}$ steigt die Belegungsdichte um fast das doppelte an. Wird die eingesetzte AS-Konzentration von $0,8$ auf $1,2 \mu\text{mol/l}$ erhöht, steigt die Belegungsdichte aber nicht in diesem Maße an. Es wird angenommen, dass die AS-Belegungsdichte mit steigender eingesetzter Konzentration nicht erheblich zunimmt. Bei der hohen Spacerkonzentration in der Immobilisierungslösung ist wiederum eine Zunahme an AS mit steigender Konzentration zu erkennen, hier ist AS-Dichte aber, gegenüber einer eingesetzten Spacerkonzentration von $0,2 \mu\text{mol/l}$, insgesamt reduziert. Es ist festzustellen, dass die AS-Belegungsdichte bei der um jeweils $0,4 \mu\text{mol/l}$ zunehmenden eingesetzten Konzentration jeweils in kleineren Schritten ansteigt. Es wird daher angenommen, dass die AS-Belegungsdichte mit weiteren Konzentrationserhöhungen nicht stark zunimmt. Zudem ändert sich die Menge an immobilisiertem

Spacer mit veränderter AS-Konzentration. Eine Verringerung der immobilisierten Spacer könnte abzuleiten sein. Vergleicht man die Belegungsdichten der jeweils gleichen Konzentrationen von AS und Spacer bei sequentieller Adsorption mit der simultanen Adsorption (Abb. 11), ist zu erkennen, dass die Belegungsdichte der Spacer bei der sequentiellen Adsorption höher als die Belegungsdichte des AS ist.

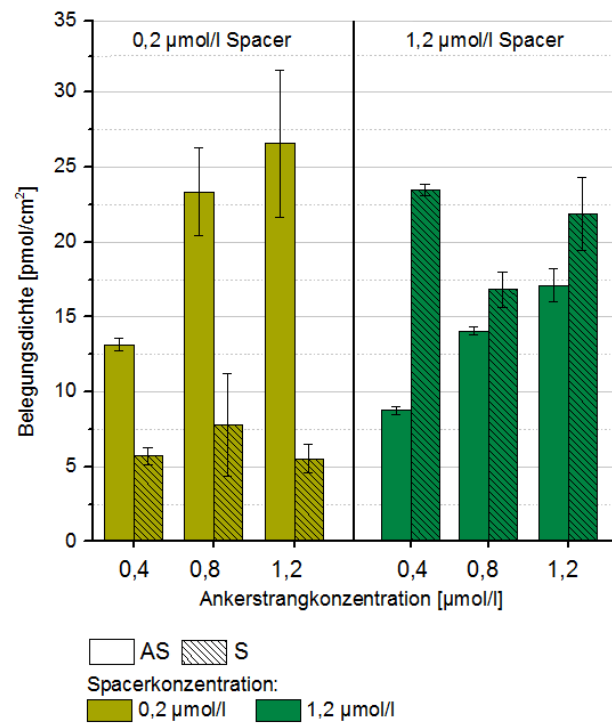


Abbildung 10: Belegungsdichte nach sequentieller Adsorption. Nach der Spaceradsorption (0,2 µmol/l und 1,2 µmol/l) wurden verschiedene AS-Konzentrationen adsorbiert und anschließend immobilisiert. Die Adsorptionszeiten betrugen jeweils 15 min. (n=3)

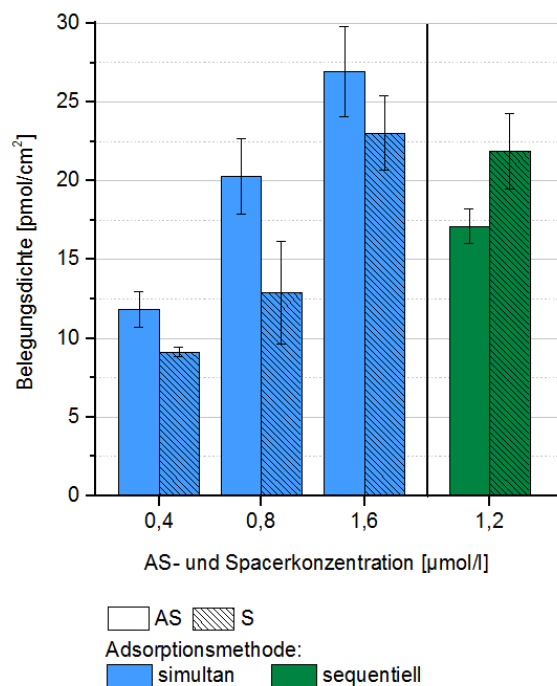


Abbildung 11: Vergleich von AS und Spacer bei simultaner und sequentieller Adsorption. AS und Spacer wurden im molaren Verhältnis 1:1 eingesetzt und auf verschiedene Arten adsorbiert. (n=3)

5.2.2.3 Hybridisierung bei sequentieller Adsorption

In Abb. 10 wurde gezeigt, dass die Zunahme der Belegungsdichte mit steigender eingesetzten AS-Konzentration abnimmt. Daher wird angenommen, dass sich bei 1,2 und 1,6 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzter Konzentration die Belegungsdichten mit AS nicht wesentlich unterscheiden. Im Sättigungsbereich der AS (1,2 und 1,6 $\mu\text{mol/l}$; Abb. 24) sind die im Experiment eingesetzten Konzentrationen der AS nicht direkt vergleichbar, die AS- bzw. GS-Belegungsdichten wurden daher in Abbildung 12 nicht überlappend dargestellt.

Generell zeigt die gemessene Belegungsdichte von GS bei Immobilisierung nach sequentieller Adsorption keine Veränderungen bei dem Einsatz einer geringen oder einer hohen Spacerkonzentration (0,2 $\mu\text{mol/l}$ und 1,2 $\mu\text{mol/l}$). Der Umfang der Belegungsdichte mit GS hängt von der verwendeten AS-Konzentration ab (Abb. 12). Die GS-Belegung liegt bei AS-Konzentrationen von 0,4 $\mu\text{mol/l}$ bis 1,6 $\mu\text{mol/l}$ zwischen 7 und 11 pmol/cm^2 . Erkennbar ist ein geringer Anstieg von 0,4 auf 0,8 $\mu\text{mol/l}$ AS, aber eine sich andeutende Sättigung bei 0,8 zu 1,6 $\mu\text{mol/l}$ eingesetzten AS. Werden die immobilisierten AS in die Betrachtung einbezogen, sind aber deutliche Unterschiede zwischen den Belegungsdichten mit variierender Spacerkonzentration

zu erkennen. Je mehr Spacer eingesetzt wird, desto geringer ist die immobilisierte AS-Menge (s. Abb. 10). Dies wirkt sich nicht auf die absolute Belegung der GS aus. Die Hybridisierungseffizienz ist bei der Immobilisierung von AS mit einer hohen Spacerkonzentration am größten.

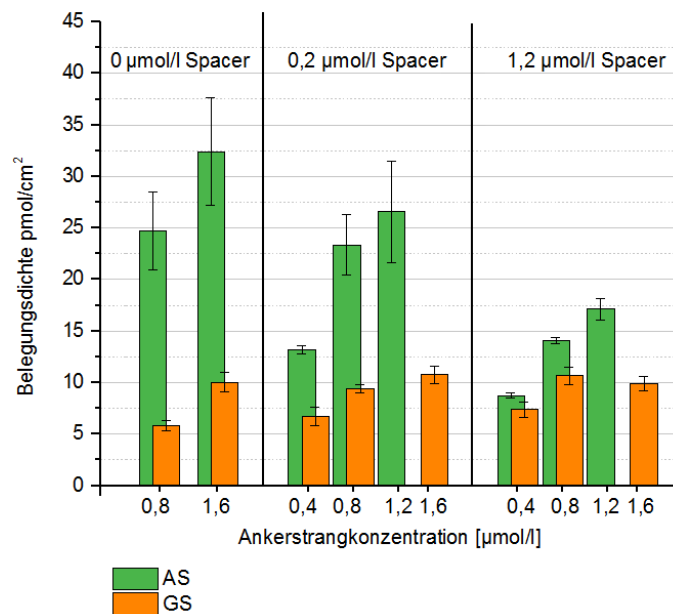


Abbildung 12: Hybridisierung bei sequentieller Adsorption. 0; 0,2 oder 1,2 $\mu\text{mol/l}$ Spacer wurden vor verschiedenen AS-Konzentrationen adsorbiert. Adsorptionszeit jeweils 15 min. Nach der Immobilisierung erfolgte die Hybridisierung mit GS₂₅. ($n \geq 3$)

5.2.2.4 Vergleich von Adsorptionsmethoden bei Hybridisierung

In Abbildung 13 wird der Einfluss von sequentieller und simultaner Adsorption auf die GS-Dichte verglichen, wobei auf die immobilisierte Menge an AS Bezug genommen wird. Zwischen beiden Adsorptionsmethoden der Anker- und Spacerstränge in ähnlich hohen Konzentrationen (je 1,6 und 1,2 $\mu\text{mol/l}$) wird kein Unterschied der absoluten GS-Belegung festgestellt (ca. 10 pmol/cm^2 GS). Eine verbesserte Hybridisierungsfähigkeit ist aufgrund der geringeren immobilisierten AS-Menge bei sequentieller Adsorption erkennen. Im Vergleich der Methoden der verlängerten Adsorptionsdauer (19,5 h) und der sequentiellen Adsorption ist die Hybridisierungsfähigkeit des AS bei letzterer Methode deutlich effektiver, obwohl die absolute Menge an AS und GS bei einer längeren Adsorptionsdauer höher ist. Die simultane Adsorption von AS und Spacer bei 15 min Adsorptionszeit zeigt bei einer höheren eingesetzten und immobilisierten AS-Konzentration (0,8 $\mu\text{mol/l}$ bzw. 19 pmol/cm^2) genauso viel GS, wie die sequentielle Adsorption mit einer geringeren eingesetzten Konzentration

und Belegungsdichte an AS ($0,4 \mu\text{mol/l}$ bzw. 7 pmol/cm^2). Zwischen sequentieller Adsorption und einer gleichzeitigen Adsorption von AS und Spacer über 19,5 h zeigt sich eine etwas erhöhte Absolutbelegung an GS bei der verlängerten Adsorptionszeit.

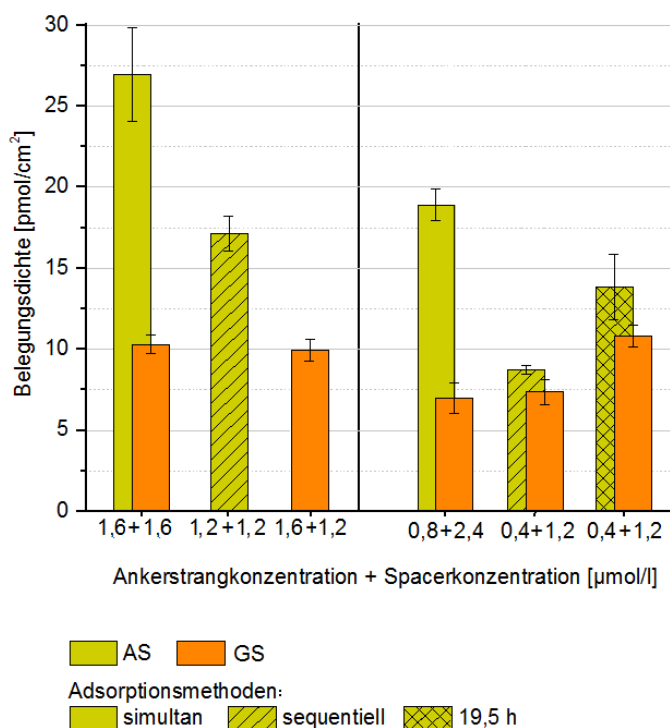


Abbildung 13: Vergleich der GS-Belegung bei verschiedenen Adsorptionsmethoden. AS-Konzentration: 1,6; 0,8; und $0,4 \mu\text{mol/l}$. Spacerkonzentration: 1,2 bzw. $1,6 \mu\text{mol/l}$. Simultan: AS und Spacer wurden gleichzeitig adsorbiert. Sequentiell: Spacer wurde vor dem AS adsorbiert. Adsorptionszeit: 15 min. 19,5 h: die simultane Adsorptionszeit betrug 19,5 h. ($n \geq 3$)

5.3 Untersuchungen zur Hybridisierung

In diesem Kapitel wird der Einfluss verschiedener GS auf deren Bindung und deren Stabilität auf der Probe dargestellt. Dazu gehören Ergebnisse zur Untersuchung verschiedener eingesetzter Gegenstränge, Hybridisierungen an Oberflächen, die durch verschiedene Adsorptionsmethoden erreicht wurden und Hybridisierungen mit verschiedenen Reaktionsbedingungen. Als Gegenstränge wurden GS_{25} (25 mer), GS_{20} (20 mer), $\text{GS}_{25/3F}$ (25 mer) und ein nicht zur Hybridisierungssequenz des AS komplementärer Strang ($\text{GS}_{25/nk}$, 25 mer) verwendet. $\text{GS}_{25/3F}$ besitzt drei Basen, welche nicht zur Hybridisierung mit dem AS geeignet sind. $\text{GS}_{25/nk}$ ist nicht komplementär zur Hybridisierungssequenz des AS und dient als Negativkontrolle. Die Abbildungen der GS-Belegungsdichten zeigen die jeweils vorhandenen AS-Belegungen zum Zeit-

punkt der Hybridisierung an. Bei sterilisierten Proben wurde die AS-Belegungsdichte nicht bestimmt. Die Stabilität wird als relative Belegungsdichte zu verschiedenen Desorptionszeitpunkten im Bezug auf die Belegungsdichte vor der Desorption definiert.

5.3.1 Hybridisierung verschiedener Gegenstränge

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse von Experimenten zur Untersuchung verschiedener Gegenstränge auf Titanoberflächen mit 0,8 und 1,6 $\mu\text{mol/l}$ AS-Lösung zur Immobilisierung. $\text{GS}_{25/nk}$ besitzt eine vergleichsweise geringe Belegungsdichte bei beiden eingesetzten AS-Konzentrationen (Abb. 14). Der $\text{GS}_{25/3F}$ zeigt auf beiden Oberflächenzuständen gleiche Belegungsdichten von ca. 4 pmol/cm^2 . GS_{25} und GS_{20} hingegen zeigen im Vergleich zu $\text{GS}_{25/3F}$ und $\text{GS}_{25/nk}$ deutlich höhere Belegungsdichten. Dabei nimmt die GS-Belegungsdichte jeweils mit steigender Menge an immobilisiertem AS zu. Es kann festgestellt werden, dass die Belegungsdichte des kürzeren GS_{20} gegenüber GS_{25} jeweils ca. 2 pmol/cm^2 höher ist. Insgesamt liegen die Oberflächenbelegungen bei GS_{25} bei ca. 5-10 pmol/cm^2 und bei GS_{20} bei 7-14 pmol/cm^2 .

Abbildung 15 zeigt deutlich, dass bei GS_{20} eine generell höhere HE vorliegt als bei GS_{25} . Zusätzlich fällt die HE bei Oberflächen mit einer höheren Konzentration an immobilisiertem AS in beiden Fällen größer aus, sodass eine maximale HE von 66% mit GS_{20} realisiert wird.

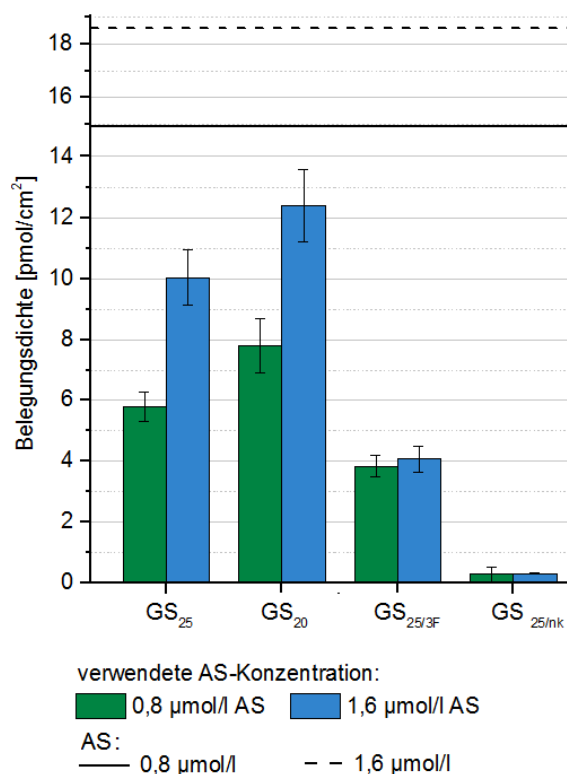


Abbildung 14: Vergleich verschiedener GS. Immobilisiert wurden jeweils 0,8 µmol/l und 1,6 µmol/l AS. Eingesetzt wurden der 25 mer GS₂₅, der 20 mer GS₂₀, der 25 mer GS_{25/3F} mit drei Fehlbasen und als Negativprobe der GS_{25/nk}. (n=9 bei 0,8 µmol/l AS; n=3 bei 1,6 µmol/l AS)

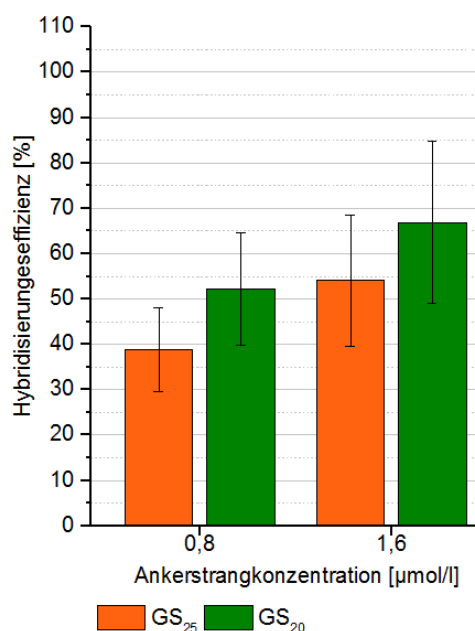


Abbildung 15: Hybridisierungseffizienz. Vergleich der Hybridisierungseffizienz von GS₂₅ und GS₂₀ bei 0,8 µmol/l und 1,6 µmol/l AS-Beschichtung ($n \geq 3$)

5.3.2 Modifizierung von Hybridisierungsbedingungen

Abbildung 16 vergleicht die Hybridisierungsmethode im Standard-Protokoll mit modifizierten Hybridisierungsmethoden. Hier werden verschiedene Hybridisierungstemperaturen (37°C, 60°C) und unterschiedlichen Zusammensetzungen der Hybridisierungslösung (GS-Lösung als Standard, PBS, Kalium-freier PBS, Zusatz von 1 mmol/l MgCl_2) gegenübergestellt. Deutliche Unterschiede zur Standardhybridisierung sind bei der Zugabe von 1 mmol/l MgCl_2 -Lösung zu erkennen, da hier mehr als doppelt soviel GS nachgewiesen werden kann (11,7 pmol/cm²). Eine Erhöhung der Hybridisierungstemperatur von RT auf 37°C zeigt ebenfalls eine Zunahme der Belegungsdichte (8 pmol/cm²), welche bei einer Hybridisierungstemperatur von 60°C weiter zunimmt (11 pmol/cm²). Die Verwendung von PBS und Kalium-freiem PBS während der Hybridisierung zeigt eine etwas erhöhte Belegung mit GS gegenüber dem Vergleichszustand.

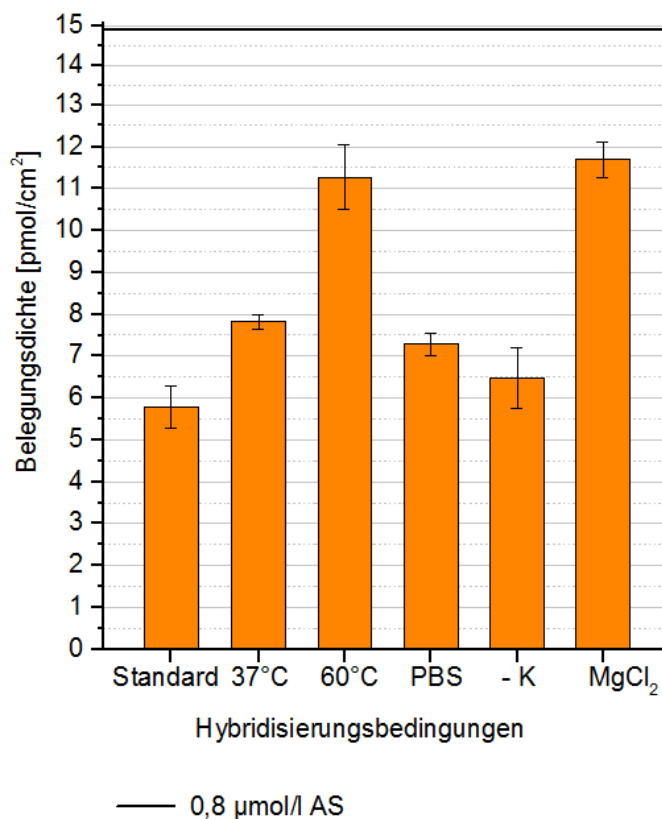


Abbildung 16: Hybridisierungsbedingungen. GS₂₅ wurde unter Einfluss verschiedener Faktoren auf einer 0,8 µmol/l AS-beschichteten Titanoberfläche hybridisiert. Standard: Verwendung der Standard-Hybridisierungsbedingungen. 37°C/60°C Veränderung der Temperatur während der Hybridisierung. PBS/-K/ MgCl₂: Verwendung von PBS, kaliumfreien PBS bzw. MgCl₂ in GS-Lösung. (n=9 bei Standard und MgCl₂; n=6 bei 37°C, PBS und -K; n=3 bei 60°C)

Die nachfolgende Abbildung (Abb. 17) stellt die Bindungskinetik von GS₂₅ und AS nach der Hybridisierung dar. Die Hybridisierung wurde unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Die Abbildung zeigt, dass die absoluten Belegungsdichten mit GS bei einer Hybridisierung bei 60°C und bei Zugabe von MgCl₂ jeweils über den untersuchten Zeitraum am größten sind. Bei einer Verwendung von PBS oder kaliumfreien PBS zur Hybridisierung sind nach einer Desorptionszeit von 2h und im weiteren Zeitverlauf die geringsten Oberflächenbelegungen mit GS nachzuweisen. Mit Betrachtung der relativen Belegungsdichte ist außerdem zu erkennen, dass der Gegenstrang bei diesen Hybridisierungsbedingungen bereits nach kurzer Zeit nicht mehr nachzuweisen ist. Die Verwendung der Hybridisierungslösung mit der Konzentration von 1 mmol/l MgCl₂ zeigt im Vergleich zur Standard-Hybridisierung ebenfalls eine herabgesetzte Stabilität. Die Hybridisierung bei 60°C zeigt keinen Einfluss auf die Stabilität, eine Erhöhung dieser ist nicht zu erkennen.

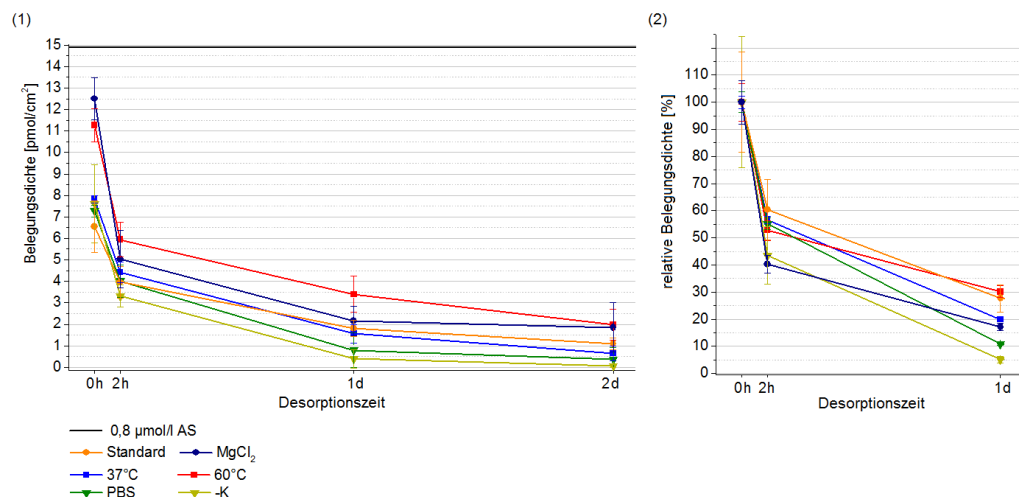


Abbildung 17: (1) Kinetik und (2) Stabilität der GS-Belegung nach verschiedenen Hybridisierungsbedingungen. Lagerung bei 37°C in Desorptions-Puffer. (n=9 bei Standard und MgCl₂; n=6 bei 37°C, PBS und -K; n=3 bei 60°C)

Um den Einfluss von MgCl₂ auf die Stabilität der Hybride von AS neben GS₂₅ auch mit GS₂₀ und GS_{25/3F} zu untersuchen, wurde die Belegung der Oberfläche mit GS bis zu 4 d nach der Hybridisierungsreaktion verfolgt. In nachfolgender Abbildung (Abb. 18) ist die vorhandene Belegungsichte und die Stabilität von GS₂₅, GS₂₀ und GS_{25/3F}, jeweils mit und ohne Zugabe von MgCl₂ (1 mmol/l) im Zeitverlauf von vier Tagen dargestellt. Die AS-Belegung beträgt ca. 14,9 pmol/cm² (eingesetzte Konzentration: 0,8 µmol/l). Gegenstränge, welche zur Hybridisierungsreaktion mit 1 mmol/l MgCl₂ versetzt wurden, weisen bis zu 1 d nach der Reaktion eine höhere Belegung als deren Vergleichszustände ohne MgCl₂ auf. Vor der Desorption sind die Belegungsichten von GS₂₅ und GS_{25/3F} mit MgCl₂ doppelt so hoch wie ohne MgCl₂. Nach einem Tag Desorption sind die Belegungsichten der GS mit und ohne MgCl₂-Konzentration vergleichbar. In Abbildung 19 ist die Belegungsichte derselben Stränge mit und ohne MgCl₂ bei einer AS-Belegungsichte von rund 18,5 pmol/cm² (eingesetzte Konzentration: 1,6 µmol/l) dargestellt. Auch hier ist mit MgCl₂-Einsatz eine höhere Belegungsichte als ohne MgCl₂ erkennbar. Im Vergleich zu einer AS-Dichte von 14,9 pmol/cm² wird die Gesamtbelegungsichte nicht erhöht. Unter Verwendung von MgCl₂ wird die Belegung der Oberfläche durch GS_{25/3F} verdoppelt, durch GS₂₅ nicht.

Die relativen Belegungsichten zeigen, dass, sowohl bei 0,8 als auch bei 1,6 µmol/l eingesetztem AS, die Stabilität der GS mit MgCl₂ bei der Hybridisierung verringert wird (Vgl. Abb. 18 und 19).

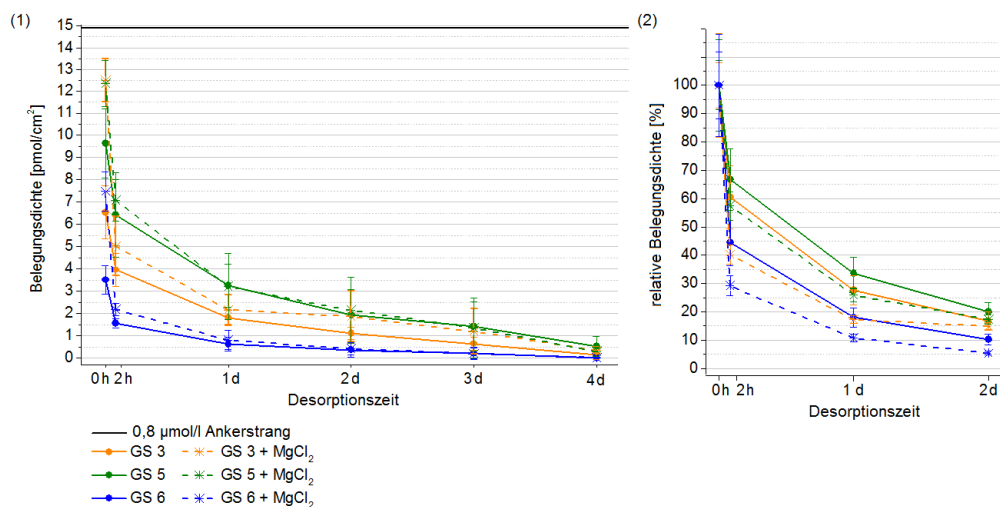


Abbildung 18: Gegenstränge GS₂₅, GS₂₀ und GS_{25/3F} auf 0,8 µmol/l AS-Beschichtung. Desorption der hybridisierten Proben in Desorptions-Puffer bei 37°C. Als Referenz dient die Menge AS nach 1 h Inkubation. a) Kinetik der Belegungsdichte mit GS nach 4 d Desorption. b) Stabilität der GS-Belegung. Prozentuale Anteile bezogen auf 0 h nach Hybridisierung. (n = 9)

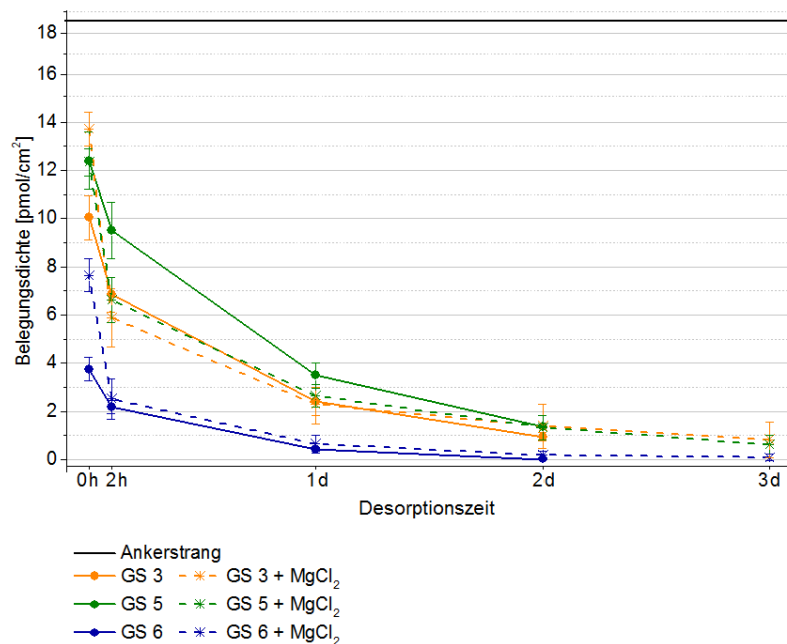


Abbildung 19: Kinetik von GS₂₅, GS₂₀ und GS_{25/3F} auf 1,6 µmol/l AS-Beschichtung. Desorption der hybridisierten Proben bei 37°C in Desorptions-Puffer. Als Referenz dient die Belegung an AS nach 1 h Desorption. (n = 9)

5.3.3 Modifizierung der Probenvorbereitung auf Sterilisierung

Um eine möglichst hohe absolute Belegungsdichte mit GS nach einer Sterilisierung der Titanproben zu erreichen, wurden die Proben auf verschiedene Arten auf die Sterilisierung vorbereitet und miteinander verglichen (Abb. 20).

Die Art der Vorbehandlungen, d.h. das Einschweißen der Proben unter Argonatmosphäre, unterscheidet sich im Bezug auf die Belegungsdichte mit GS im Glovebag nicht von dem in einer Handschuhbox. Die Behandlungen in beiden Umgebungen zeigen große Schwankungen der GS-Belegung. Auch der Einsatz von OS nach der Immobilisierung der AS zeigt nur geringe Erhöhungen der Belegungsdichte mit GS nach dem Sterilisierungsprozess. Deutlich wird jedoch, dass ein Einschweißen der Probenstücke unter Raumluftatmosphäre die Belegungsdichte verringert. Die GS-Belegung ist hier nur halb so groß wie die der standardmäßig genutzten Variante im Glovebag.

Wird bei sterilisierten Proben eine GS-Lösung mit MgCl_2 -Konzentration eingesetzt, verbessert sich die absolute Belegungsdichte mit GS deutlich. Jedoch zeigen die Messungen in Argonkammer und Glovebag große Schwankungen an.

Abbildung 21 zeigt die Belegungsdichte mit GS und die Stabilität von GS_{25} und GS_{20} anhand deren relativen Belegungsdichten auf zuvor sterilisierten Ankerstrangbeschichteten Titanproben. Zur Vorbereitung auf die Sterilisierung wurden die Proben unter Argonatmosphäre im Glovebag eingeschweißt. Es ist ein besonders großer Einfluss des MgCl_2 auf die Belegungsdichte beider Gegenstränge zu erkennen. Dieser lässt sich bis zu 4 d Desorption verfolgen. Zusätzlich wird die Stabilität für die Belegung mit GS_{20} bei einer Hybridisierung mit MgCl_2 erhöht und mit GS_{25} nicht.

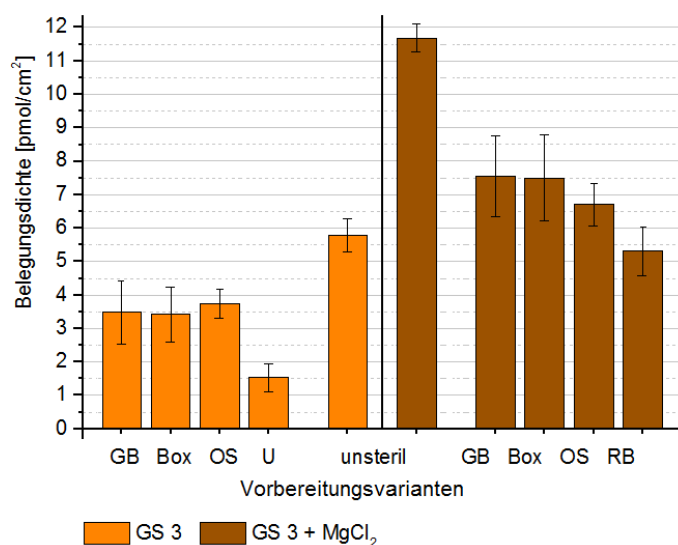


Abbildung 20: Hybridisierung nach unterschiedlicher Vorbereitung zur Sterilisierung. Vor Hybridisierung mit GS₂₅ wurden die 0,8 $\mu\text{mol/l}$ AS-beschichteten Probenstücke einem Sterilisierungsprozess unterzogen. Zu sehen sind verschiedene Methoden der Probenvorbehandlung. GB: Einschweißen der Proben unter Argonatmosphäre im Glovebag. Box: Einschweißen der Proben unter Argonatmosphäre in einer Handschuhkammer. OS: Zusatz von Opferstrang nach der Immobilisierung von Ankerstrang, Einschweißen unter Argonatmosphäre in Glovebag. U: unbehandelt, Einschweißen unter Luftatmosphäre. ($n \geq 3$)

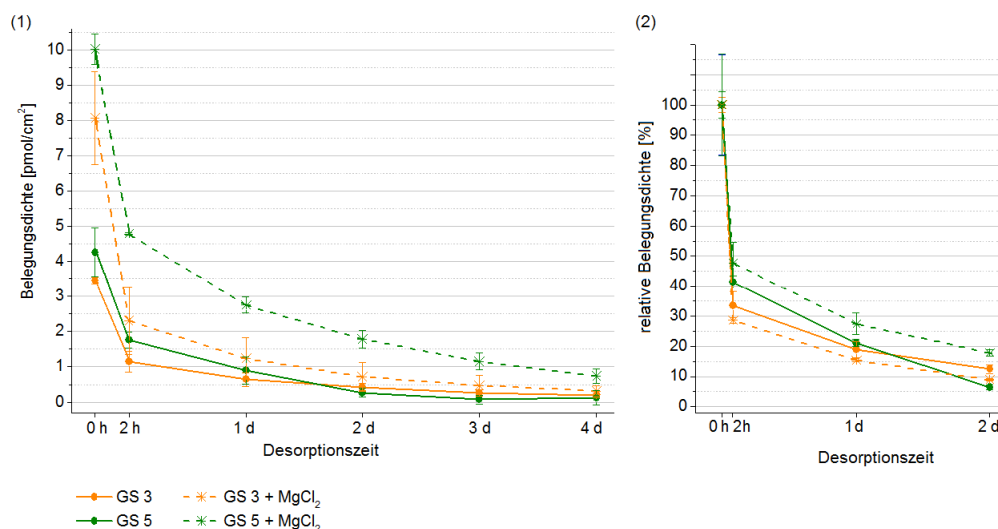


Abbildung 21: Gegenstränge GS₂₅ und GS₂₀ auf sterilen, 0,8 $\mu\text{mol/l}$ AS-beschichteten Titanproben. (1) Kinetik der vorhandenen GS-Belegung nach 4 d Inkubation. (2) relative Belegungsdichte mit GS. Prozentuale Anteile bezogen auf 0 h nach Hybridisierung. Die Proben wurden unter Argonatmosphäre im Glovebag eingeschweißt. Desorption der hybridisierten Proben in bei 37°C in Desorptions-Puffer. ($n = 3$)

6 Diskussion der Ergebnisse

Im Folgenden werden die in Kapitel 5 beschriebenen Ergebnisse diskutiert und Vorschläge zur Erklärung der gefundenen Ergebnisse gegeben. Dabei wird im ersten Abschnitt das Immobilisierungs- und Hybridisierungsverhalten von Ankersträngen und ko-immobilisierten Spacersträngen analysiert. Der nächste Abschnitt beschäftigt sich mit der Hybridisierung von Ankerstrang und Gegenstrang, um mögliche Einflussfaktoren der Hybridbildung zu analysieren. Abschnitt drei vergleicht verschiedene Methoden, um die Ankerstränge vor Schädigungen bei der Sterilisierung zu schützen.

6.1 Adsorption in Anwesenheit des Spacers

6.1.1 Oberflächenbelegung bei simultaner Adsorption

Um immobilisierte ODN-Stränge zur Hybridisierung nutzen zu können, müssen die Hybridisierungssequenzen der Ankerstränge für Gegenstränge erreichbar sein. Die Voraussetzungen dafür sind, dass die Hybridisierungssequenzen der AS nicht mit der anodischen Oxidschicht wechselwirken oder eine zu hohe Dichte aufweisen. Das führt bei der Hybridisierung zu sterischen Hinderungen oder Bildung von Mehrfachhybrid. Um eine Wechselwirkung der AS mit der Titanoberfläche zu minimieren und um Abstände zwischen den Hybridisierungssequenzen der AS zu erhalten, wurden kurze ssDNS-Sequenzen (ssDNS) als laterale Spacer eingeführt. Abbildung 22 soll diese Modellvorstellung verdeutlichen.

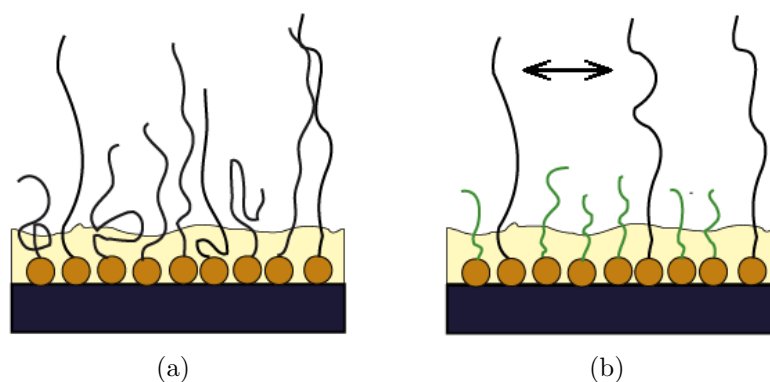


Abbildung 22: Modell zur Adsorption von AS und Spacer. (a) zeigt die Adsorption und Hybridisierung von AS ohne Spacer, die AS sind sehr dicht und interagieren mit der Oberfläche. (b) zeigt die Adsorption und Hybridisierung mit Einsatz von Spacer. Die AS können räumlich getrennt werden und eine Intereaktion mit der Oberfläche wird verhindert.

Aufgrund ihrer 5'-terminalen Phosphatgruppe sollten beide Stränge dieselbe hohe

Affinität dieser terminalen Phosphatgruppe zur Titanoberfläche aufweisen. Außerdem besitzen beide Stränge dieselbe Spacersequenz. Die Annahme war, dass die Anzahl der terminalen Phosphat-Gruppen die Oberflächendichte bestimmt. Somit könnte der 30 mer Spacer durch seine schnellere Diffusion verglichen mit dem 60 mer AS bei der Adsorption an der Oberfläche begünstigt werden.

Werden Spacer und AS im Konzentrationsverhältnis von 3:1 immobilisiert, ist die Belegungsdichte von Spacer höher als die vom AS, aber nicht entsprechend der eingesetzten Verhältnisse (Abb. 6). Die Ergebnisse zeigten zusätzlich bei gleichen Konzentrationen von AS und Spacer eine größere Menge AS auf der Probe. Der längere AS geht eine intensivere Wechselwirkung mit der Probenoberfläche ein. Möglich ist, dass der AS den vor ihm adsorbierten Spacer von der Oberfläche drängt und seinen Platz einnimmt. Die andere Möglichkeit besteht darin, dass der AS zuerst adsorbieren kann und der Spacer nicht in der Lage ist, den AS zu verdrängen.

Eine Variation der Adsorptionsdauer von AS und Spacer im Konzentrationsverhältnis 1:3 sollte Hinweise auf eine der beiden Thesen geben. Eine längere Adsorptionszeit zeigt generell eine höhere Gesamtbelegung der Oberfläche (ca. 43 pmol/cm² nach 19,5 h) als eine kurze Adsorptionszeit (ca. 26 pmol/cm² nach 5 min)(s. Abb. 8). Beide Stränge können in größeren Mengen adsorbieren und keiner der beiden Stränge wird verdrängt. Mit zunehmender Adsorptionsdauer verschiebt sich das Verhältnis der Oberflächenbelegung in Richtung der AS. Daraus ist zu schließen, dass der AS durch ein höheres Ausmaß an Wechselwirkungen eine höhere Affinität zur Oberfläche besitzt. Die Ankerstränge werden als flexible Moleküle betrachtet, welche mehr oder weniger über die komplette zugängliche Konformation mit der Titanoberfläche wechselwirken können. Im Laufe der Zeit kann sich die Konformation ändern, sodass sich kleinere Teile der Moleküle in Wechselwirkung mit der Oberfläche befinden. Es wird angenommen, dass sich die Stränge während der Adsorptionsphase auf der Oberfläche organisieren, sodass ein Gleichgewichtszustand erreicht wird. Mit zunehmender Adsorptionszeit nähert sich die Oberflächenbelegung diesem Zustand. Es ist möglich, dass nach einer Adsorptionszeit von mehr als 19,5 h eine weitere Verteilung der Oberfläche in Richtung des Gleichgewichtes erfolgt und der AS weiter adsorbieren kann. Die Zeit zum Erreichen des Gleichgewichtszustands kann von der Nukleotidlänge abhängig sein.

Steel et al. (2000) beschreiben, dass sich lange DNS-Sequenzen wie flexible Polymerketten verhalten und daher teilweise nach Monaten den Gleichgewichtszustand erreichen. Diese Arbeitsgruppe variierte die Adsorptionszeit einer 16 mer ssDNS-Sequenz mit Thiol-Linker von 5 min bis zu 20 h. Deren Ergebnis zeigte einen Anstieg

der adsorbierten Menge bis zu 20 h Adsorptionszeit, aber bereits nach 2 h wurden 80 % dieser Menge nachgewiesen (Steel et al. (2000)). In der Arbeit von Steel et al. (2000) wird darauf hingewiesen, dass die langen Moleküle, insbesondere wenn keine Thiolgruppen vorhanden sind, mehr Wechselwirkungen mit der Oberfläche eingehen und dadurch schwerer zu verdrängen sind. Die Ergebnisse der Gruppe um Steel *et. al* sind nicht vollständig auf die eigenen Ergebnisse übertragbar. Thiole besitzen eine sehr starke Affinität zu Gold, welche in ihrer Intensität nicht mit der Adsorption von Phosphaten auf Titanwerkstoffen vergleichbar ist.

In Abhängigkeit der Adsorptionszeit steigt die Belegungsdichte von AS und Spacer in den selbst durchgeführten Experimenten etwas an. Es kann vermutet werden, dass die generelle Oberflächenverteilung zwischen beiden Strängen nach 15 min Adsorptionszeit bereits relativ nahe am Gleichgewichtszustand liegt und eine Adsorptionszeit von 15 min für die Durchführung weiterer Experimente ausreichend ist.

Weiterhin wurden nach verschiedener Adsorptionsdauer immobilisierte AS und Spacer hinsichtlich ihrer Kinetik untersucht (Abb. 9). Dabei konnte festgestellt werden, dass vor allem die Belegungsdichte der Spacerstränge nach 1 h Desorption stark abgenommen hat. Die immobilisierte Menge an Spacer ist rund 2 pmol/cm² höher als die immobilisierte Menge an AS nach 1 h Desorption. Es ist anzunehmen, dass ein Großteil der adsorbierten Stränge, insbesondere der Spacer, nicht oder nur mit geringer Tiefe in die anodische Oxidschicht eingebaut wurde, oder eine Adsorption an die Oberfläche stattfand. Die Inkubation in Desolutionslösung schafft bei 37°C eine physiologische und phosphathaltige Umgebung, in welcher sich nicht oder nur schwach fixierte Stränge von der Oberfläche lösen. Im weiteren zeitlichen Verlauf ändert sich an der Belegungsdichte von AS und Spacer nichts mehr, was mit früheren Experimenten zur Stabilität von AS übereinstimmt (s. Abb. 25). Schlussfolgernd ist der AS auch nach längerer Adsorptionszeit der auf der Oberfläche vorherrschende Strang.

6.1.2 Oberflächenbelegung bei sequentieller Adsorption

In weiteren Experimenten wurde die Probe vor der Adsorption verschiedener AS-Konzentrationen mit jeweils einer geringen und einer hohen Spacerkonzentration vorbelegt. Bei einer geringen Spacervorbelegung lässt sich die immobilisierte Menge an Spacer nicht von der steigenden AS-Belegung mit zunehmender AS-Konzentration verdrängen. Es kann angenommen werden, dass der AS mit steigender Konzentration immer noch freie Flächen zu Adsorption findet, ohne den Spacer in hohem

Maße verdrängen zu müssen. Mit hohen vorgelegten Spacerkonzentrationen konnte die Oberfläche in einen Sättigungszustand versetzt werden, wobei der AS nicht mehr in dem Maße adsorbieren kann, wie bei einer geringen oder ohne Spacervorbelegung (s. 24). Die Konkurrenz um den vorhandenen Platz wird stärker. Trotzdem steigt die AS-Menge mit der eingesetzten Konzentration an und der Spacer wird teilweise verdrängt. Im Vergleich zur simultanen Adsorption und anschließender Immobilisierung bei gleichen Konzentrationen von AS und Spacer ist der AS aber nicht mehr der mengenmäßig dominierende Strang auf der Probe.

In Hybridisierungsversuchen bei Immobilisierung nach sequentieller Adsorption zeigen die Gegenstränge bei gleichen eingesetzten AS-Konzentrationen, aber verschiedenen eingesetzten Spacerkonzentrationen, gleiche Mengen an gebildetem Hybrid (Abb. 12). So stellt sich heraus, dass durch den Einsatz hoher Spacermengen, wenn die AS-Adsorption herabgesetzt wird, im Verhältnis mehr Hybrid gebildet werden kann, als bei Verzicht auf Spacer oder geringen Spacerkonzentrationen. Das Verhältnis von AS zu Gegenstrang, was als Hybridisierungseffizienz (HE) bezeichnet wird, nimmt mit der Spacervorbelegung zu. Im Vergleich zwischen simultaner und sequentieller Adsorption im Sättigungsbereich wurden jeweils verschiedene Konzentrationen an AS eingesetzt, jedoch liegen diese im selben Größenbereich (Vgl. Abb. 13). Eine hohe HE erfolgt lediglich bei Immobilisierung nach einer dichten Vorbelegung mit Spacer und anschließender Adsorption des AS. Es konnte gezeigt werden, dass die Zunahme der Hybridisierungseffizienz nicht allein an der hohen Gesamtbelegungsdichte der Oberfläche, sondern an der zeitlichen und damit bedingten räumlichen veränderten Anordnung von Spacerstrang und AS liegt. Es wird vermutet, dass der AS sich zwischen die Spacer lagert und aufgrund höherer Affinität zur Oberfläche teilweise Spacermoleküle verdrängt. Die Spacerstränge könnten folgendermaßen zu einem Schutz der Ankerstränge führen. Die Spacerstränge werden zwar bei Adsorption des AS mittels 5'-terminaler Phosphatgruppe von ihrem Platz auf der Oberfläche verdrängt, umgeben den adsorbierten AS aber in der Überzahl, sodass eine Interaktion der Hybridisierungssequenzen mit der Oberfläche oder mit anderen Hybridisierungssequenzen verhindert wird. Somit können die Hybridisierungssequenzen über die Spacer hinaus in die Lösung ragen und von GS erreicht werden. Abbildung 23 verdeutlicht diese Modellvorstellung.

Wird eine AS-Konzentration von $0,4 \mu\text{mol/l}$ und eine dreifach so hohe Spacerkonzentration eingesetzt, zeigt eine sequentielle Adsorption im Vergleich zu einer verlängerten Adsorptionszeit (19,5 h) bei simultaner Adsorption eine höhere HE. Dabei liegt die absolut hybridisierte Menge bei der sequentiellen Adsorption im

selben Größenbereich wie bei einer simultanen Adsorption von $0,8 \mu\text{mol/l}$ eingesetztem AS und der dreifach so hohen Spacerkonzentration (Abb. 13). Die HE der AS nimmt durch eine sequentielle Adsorption von Spacer und AS zu. Damit kann gezeigt werden, dass die Reihenfolge der Adsorption von AS und Spacer die Hybridisierbarkeit beeinflusst. Vermutlich ändert sich mit der Adsorptionsreihenfolge der einzelnen Stränge auch die Wechselwirkung mit der Oberfläche und damit die Orientierung beider Stränge. Eine Änderung des Adsorptionsmechanismus selbst kann mit den quantitativen Beschreibungen nicht belegt werden. Das Optimum der Hybridisierungseffizienz wurde in dieser Arbeit bei einer Spacervorbelegung von $1,2 \mu\text{mol/l}$ und einer AS-Konzentration von $0,4$ bis $0,8 \mu\text{mol/l}$ erreicht. Eine positive Wirkung auf die Stabilität der Hybride wurde durch eine sequentielle Adsorption aber nicht erzielt (s. 28, A.3). Daher konnten zwar Erkenntnisse bezüglich der Hybridisierbarkeit der AS gewonnen, die hybridisierbare Absolutmenge in Bezug auf die eingesetzte ODN-Menge und dem Zeitaufwand aber nicht erhöht werden. Eine hohe Spacervorbelegung und damit eine Oberfläche im Sättigungsbereich, lässt insgesamt weniger AS adsorbieren, setzt aber die Hybridisierungseffizienz der immobilisierten AS hinauf.

Die Oberflächendichte stellt generell einen begrenzenden Faktor dar, welcher die Fähigkeit der immobilisierten Stränge zur Hybridisierung beeinflusst (Peterson et al. (2001)). Eine dicht mit DNS belegte Oberfläche wirkt sich aufgrund sterischer und elektrostatischer Effekte generell negativ auf die Hybridisierungseffizienz der eingesetzten ODNs aus (Peterson et al. (2001); Steel et al. (1998)). Die Gruppe von Boozer *et al.* nutzte ebenfalls Abstandshalter zwischen 24 mer ssDNS-Sequenzen in Form von Oligoethylenglycol (OEG), um selbstorganisierende Monoschichten (self-assembled monolayers, SAM) herzustellen, als Linker wurden Thiolgruppen verwendet. Hier konnte eine Abhängigkeit der Oberflächendichte mit DNS von der OEG-Konzentration festgestellt werden, wobei mit einer simultanen Adsorption und einer konstanten Konzentration DNS und variierender OEG-Konzentration gearbeitet wurde. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass für geringe Konzentrationen eingesetzter OEGs die Menge für die komplementären Stränge erreichbaren ssDNS herabgesetzt wird. Zu geringe OEG-Konzentrationen ermöglichen die Adsorption einer Vielzahl von DNS-Strängen, durch deren hohe Dichte aber weniger Hybrid gebildet werden konnte. Keighley *et al.* berichten von Versuchen, in denen ssDNS (18 mer) und Mercaptohexanol (MCH) mittels Thiolgruppe simultan immobilisiert werden. Dabei wurde das Verhältnis von ssDNS zu MCH auf der Oberfläche variiert, und die Oberflächenbelegung und die Hybridisierungseffizienz mit ssDNS untersucht. Auch

dabei konnte mit steigender Oberflächendichte der ssDNS eine sinkende HE gezeigt werden (Keighley et al. (2007)). Die Wahrscheinlichkeit multipler partieller Matches von Hybridisierungssequenzen ist mit dichten AS-Belegungen hoch (Chan et al. (1995); Vainrub and Pettitt (2003)). Dies kann ein Grund für die geringe Hybridisierungseffizienz beim Einsatz von relativ hohen AS-Konzentrationen und wenig oder keinem Spacereinsatz sein. Es kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass eine dicht mit AS belegte Oberfläche die HE herabsetzt, eine dicht mit Spacer belegte Oberfläche die HE der AS jedoch steigert.

Viele Arbeiten beschäftigen sich mit einer oberflächengekoppelten DNS-Hybridisierung im Zusammenhang mit Biosensoren, wo oft mit Sequenzen einer Länge von 18 – 25 mer gearbeitet wird (Keighley et al. (2007); Boozer et al. (2004); Steel et al. (1998)). In den eigenen Arbeiten wurde dagegen mit langen AS-Sequenzen von 60 Nukleotiden gearbeitet, welche Hybridisierungsbereiche von 25 mer besaßen. Dabei ist zu beachten, dass lange DNS-Sequenzen mit langkettigen Polymeren zu vergleichen sind und ein ähnlich flexibles Verhalten an Oberflächen aufweisen (Steel et al. (2000)). Interaktionen zwischen den in diesen Experimenten eingesetzten AS selbst können aufgrund deren sequentiellen Zusammensetzung ausgeschlossen werden. Es wird allgemein angenommen, dass die Stränge in coil-ähnlichen Konformationen mit der Oberfläche interagieren. Bei der anodischen Verdickung der Oxidschicht werden sie folglich in solchen Konformationen eingebaut, wodurch die Hybridisierbarkeit ebenfalls stark herabgesetzt werden kann. Wie gezeigt wurde, erhöht eine Vorbelegung mit kurzen Sequenzen die Hybridisierbarkeit der AS, wobei darauf geschlossen wird, dass die AS weniger Interaktionen mit der Oberfläche eingehen konnten und die Hybridisierungssequenzen für GS zugänglich geblieben sind.

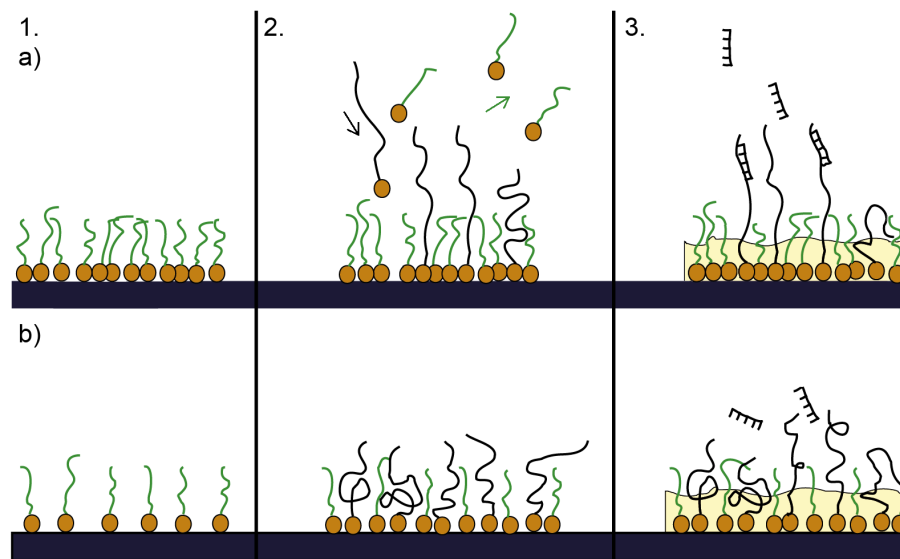


Abbildung 23: Modell zur sequentiellen Adsorption von AS und Spacer. a) zeigt den Adsorptions- und Hybridisierungsvorgang bei hoher, b) bei geringer Spaceradsorption. 1. Adsorption der Spacer. 2. Adsorption der Ankerstränge, Spacer wird in a) verdrängt. 3. Hybridisierung nach Immobilisierung. Hybride können nur an zugänglichen Hybridisierungssequenzen gebildet werden.

6.2 Hybridisierung von verschiedenen Gegensträngen

Die verwendeten Gegenstränge GS_{25} und $GS_{25/3F}$ haben eine Länge von 25 Basen. $GS_{25/3F}$ weist drei nicht komplementäre Basen (Mismatch) an den Positionen 4, 8 und 12 vom 3'-Ende aus auf. GS_{20} besitzt eine Länge von 20 mer. Als Negativkontrolle wurde eine Sequenz verwendet, deren Basensequenz nicht zur Hybridisierungssequenz komplementär ist ($GS_{25/nk}$). Da keine spezifische Bindung des $GS_{25/nk}$ beobachtet wurde (s. Abb. 14) konnte gezeigt werden, dass GS_{25} , GS_{20} und $GS_{25/3F}$ spezifisch mit dem AS interagieren und Hybrid gebildet wird. $GS_{25/3F}$ zeigt zwar die Fähigkeit zur Hybridbildung mit AS, die gebildete Hybridmenge ist aber im Vergleich zu GS_{25} und GS_{20} deutlich geringer. Das Vorhandensein von drei nicht komplementären Basen zur Hybridisierungssequenz entspricht einer 12% Basenfehlpaarung des entstandenen Hybrids. Die nicht komplementären Basen setzten die Affinität zur Hybridisierungssequenz herab und eine Hybridisierung wird behindert. Auch in Versuchen von Castelino et al. (2005) wurde eine geringere Hybridisierungseffizienz bei GS mit Mismatches festgestellt. Weiterhin ist festzustellen, dass GS_{20} sowohl auf $0,8 \mu\text{mol/l}$ als auch auf einer $1,6 \mu\text{mol/l}$ AS-Immobilisierung eine höhere Hybridisierungsfähigkeit als GS_{25} aufweist. GS_{20} besitzt einen Anteil von 30% Guanin und 15% Cytosin, GS_{25} dagegen 32% bzw. 12% und $GS_{25/3F}$ 28% bzw. 16%. Trotz der um 5 mer kürzeren Sequenz von GS_{20} unterscheidet sich der prozentuale

GC-Gehalt beider Sequenzen nicht wesentlich. Ein verändertes Hybridisierungsverhalten der untersuchten Gegenstränge aufgrund deren Zusammensetzung ist daher auszuschließen.

Offensichtlich kann die Menge der Hybridbildung durch die Länge der komplementären Sequenz beeinflusst werden. Auch in Versuchen von Castelino et al. (2005) wurde im Zusammenhang mit der Untersuchung von Goldoberflächen mit verschiedenen lange komplementären Sequenzen der Längen von 10 bis 30 Basen experimentiert. Dazu wurden jeweils 10-40 mer DNS-Sequenzen mittels 5'-Thiolgruppe immobilisiert. Mit dem 10 Basen langen GS wurden je nach Salzkonzentration bis zu 5 pmol/cm², mit dem 30 Basen langen GS bis zu 4 pmol/cm² Hybridisierungsdichte erreicht. Die Daten zur besseren Hybridisierung des kürzeren Stranges von Castelinos Gruppe stimmen mit den selbst erhaltenen Daten überein. Chan et al. (1995) stellte Analysen zur Hybridisierung oberflächengebundener DNS-Stränge und deren Hybridisierung mit GS aus heterogenen DNS-Lösungen an. Fazit dieser Studie war, dass für eine schnelle und effiziente Hybridisierung komplementärer Stränge eine möglichst kurze DNS-Sequenzlänge der GS gewählt werden sollte. Damit kann angenommen werden, dass kleinere GS-Sequenzen allgemein schneller ein Hybrid mit AS bilden. Außerdem wurde von Peterson et al. (2002) herausgefunden, dass die Hybridisierungskinetik einer GS-Sequenz von 18 Basen schneller an einer Hybridisierungssequenz von 25 Basen abläuft, wenn die 18 Basen am 3'-Ende der Hybridisierungssequenz hybridisieren, als wenn sie am 5'-Ende, d.h. näher an der Oberfläche, der Hybridisierungssequenz annealen. Mit der Verkürzung des in eigenen Versuchen verwendeten GS um 5 Basen am 5'-Ende wurden die Effekte beider Studien kombiniert. Daher ist eine schnellere Kinetik für GS₂₀, als für GS₂₅ zu erwarten.

In eigenen Versuchen wurde für die Hybridisierungsreaktion eine Zeitspanne von 1h verwendet. In Petersons Versuchen konnte eine Hybridisierungseffizienz von 100% mit beiden verwendeten GS nach 1 h erreicht werden, wenn die AS-Dichte von 5 pmol/cm² auf 2,5 pmol/cm² gesenkt wurde (Peterson et al. (2002)). Aufgrund der hohen AS-Dichten (14,9 pmol/cm² bzw. 18,5 pmol/cm²) in den eigenen Versuchen konnte die Erhöhung der Hybridisierungsdauer die absolute Hybridbildung von AS und GS erhöhen. Für eigene Untersuchungen ist die Hybridisierungszeit von 1h für Hybridisierungsuntersuchungen von GS₂₀ und GS₂₅ ausreichend. Die Hybridisierungseffizienzen für 0,8 und 1,6 µmol/l AS-Immobilisierung der Gegenstränge GS₂₅ und GS₂₀ belegen eine umfangreichere Belegung der Ankerstränge durch GS₂₀. Es wird vermutet, dass der kürzere Strang besser als der 5 Basen längere Strang zwischen den AS anlagern kann. Damit wird damit die immobilisierte AS-Menge zur

Hybridisierung stärker ausgenutzt.

GS₂₅ zeigt auf beiden Oberflächenzuständen der AS-Belegung gegenüber GS₂₀ weniger Hybrid. Möglich ist, dass bei längeren Hybridisierungssequenzen eine inkorrekte Hybridisierung in Form von Mehrfachhybridisierung bei Gegensträngen mit mehreren AS auftritt. Dadurch können nicht alle bindungsfähigen AS von GS belegt werden. Die Oberflächenbeschichtung mit der 0,8 $\mu\text{mol/l}$ AS-Konzentration kann eine Oberflächendichte von 14,9 pmol/cm^2 realisiert werden, mit der 1,6 $\mu\text{mol/l}$ AS-Konzentration eine Oberflächendichte von 18,5 pmol/cm^2 . Aufgrund der bereits hohen Belegungsdichten mit AS bei dem Einsatz von 0,8 $\mu\text{mol/l}$ AS war nicht zu erwarten, dass bei der doppelten eingesetzten Konzentration an AS auch bei GS₂₀ eine größere HE erreicht werden kann. Die AS auf der Oberfläche waren noch nicht zu dicht für das Erreichen der Hybridisierungssequenz vom GS angeordnet. Literaturquellen (Castelino et al. (2005); Boozer et al. (2004); Peterson et al. (2001)) berichten von einer Abnahme der Hybridisierungseffizienz mit zunehmender Oberflächendichte mit AS. Castelino und Boozer zeigten beispielsweise eine deutliche Abnahme der HE für verschieden lange GS bei rund 20 pmol/cm^2 AS. Dies wurde mit zunehmender elektrostatischer Abstoßung und sterischen Hinderung erklärt, welche mit der Belegungsdichte an AS ansteigen (Peterson et al. (2001)). Für GS_{25/3F} ist kein Unterschied der gebildeten Hybridmenge zwischen beiden eingesetzten Konzentrationen zu erkennen. Offensichtlich hat eine Erhöhung der Belegungsdichte keinen Einfluss auf GS mit Fehlbasen. Die durch die drei nicht komplementären Basen verringerte Affinität zur Hybridisierungssequenz scheint nicht die alleinige Ursache für eine verringerte Hybridbildung zu sein. In der Literatur werden die Unterschiede zwischen den Hybridisierungssignalen zwischen perfekt gematchten Hybriden und Basenfehlpaarungen mit unterschiedlichen Konfigurationsentropien zwischen beiden Strängen erklärt (Castelino et al. (2005)). Untersuchungen zur Kinetik und Thermodynamik der Hybridisierung von Fehlbasenpaaren wurden von Peterson *et al.* vorgenommen (Peterson et al. (2002)). Dabei konnte eine deutlich verringerte Hybridisierungseffizienz von maximal 50% bei 25 Basen langen und mit 1 und 2 Fehlbasen enthaltenden GS festgestellt werden, welche als Barriere bezeichnet wurde. Mit komplementären Sequenzen konnte eine HE von 100% erreicht werden. Die Hybridisierung von Mismatches stellte sich als weitaus komplexerer Prozess heraus, als die Hybridisierung von komplementären Strängen, welcher mit einfachen Hybridisierungsmodellen nicht zu erklären ist (Peterson et al. (2002)). Castelino *et al.* zeigte eine höhere HE bei Basenfehlpaarungen, welche sich am Ende der GS-Sequenz befinden, als bei Basenfehlpaarungen, die inmitten der GS-Sequenz auftreten. Dieses

Phänomen wurde mit der Störung des Hybridisierungsprozesses erklärt. Mit einer verminderten Anzahl komplementärer Basen innerhalb des komplementären Stranges wird der Keimbildungsprozess der Hybridisierungsreaktion verhindert und die nachfolgende „Reißverschlussreaktion“ zur Basenpaarung bleibt aus (Castelino et al. (2005)). Aufgrund einer deutlich erhöhten HE mit Basenfehlpaarungen bei einer Hybridisierungsreaktion in erwärmtem Puffer schlossen Peterson *et al.* auf veränderte Bindungsenergien, welche bei Mismatch-Sequenzen zu einer schlechteren Hybridisierungseffizienz führen (Peterson et al. (2002)). Anhand der Stabilitätsuntersuchungen ist abzuleiten, dass das Hybrid mit Basenfehlpaarung instabiler als die Hybride mit korrekten, d.h. komplementären Basenpaarungen ist. Eine Basenfehlpaarung scheint also die Freisetzung hybridisierter GS zu beschleunigen. Generell bleiben die Mengenverhältnisse für Hybride von AS mit GS₂₅, GS₂₀ und GS_{25/3F} im Zeitverlauf nach der Hybridisierung gleich. Aufgrund der ähnlichen Verläufe der Stabilitätskurven (s. Abb. 18 und 19) für die Hybride der AS mit GS₂₅ und GS₂₀ wird angenommen, dass Längenunterschiede der Hybride von wenigen Basen die Stabilität nicht beeinflussen. Deutlich längere Hybride könnten sich dabei bezüglich deren Stabilität deutlich von den hier eingesetzten Hybridlängen (20 und 25 bp) unterscheiden. Außerdem unterscheiden sich die Stabilitäten von Hybrididen, die sich in Lösung befinden von Hybrididen, die an Oberflächen gekoppelt sind. Hybride, die auf dicht mit AS beschichteten Oberflächen gebildet wurden, sind ähnlich stabil, wie Hybride die auf weniger dicht mit AS beschichteten Oberflächen gebildet wurden (s. Abb. 18 und 19). Die Menge der immobilisierten AS scheint für die Hybridstabilität keine Rolle zu spielen. Die Option der Basenfehlpaarung kann eingesetzt werden, um verschiedene Freisetzungskinetiken einzustellen. Die Freisetzungskinetik von GS wird durch Fehlbasenpaarungen im Hybrid gegenüber komplementären Hybrididen beschleunigt.

6.3 Modifizierung der Bedingungen zur Hybridisierung

Auch mit der Änderung der Hybridisierungsbedingungen lassen sich unterschiedliche Absoluthybridmengen mit GS₂₅ realisieren. Der Temperatureinfluss auf den Prozess der Hybridbildung spielt eine wichtige Rolle. Eine physiologische Temperatur zeigt bereits erhöhte Hybridmengen gegenüber dem Standard-Protokoll (RT), eine weitere Steigerung der Umgebungstemperatur auf 60°C hingegen scheint den Hybridisierungsprozess weiter zu begünstigen. Die Temperaturerhöhung auf 60°C konnte die Hybridisierungseffizienz steigern Dabei ist zu bemerken, dass eine Änderung der Umgebungstemperatur während der Hybridisierungsreaktion besondere Probenbehandlung mit sich bringt. Die Arbeitsgruppe um Peterson fand einen signifikanten

Effekt auf die Hybridisierungseffizienz heraus, wenn die Probenoberfläche vor der Hybridisierung erhitzt wird (Peterson et al. (2001)). In neueren Untersuchungen erhitzt die Gruppe ihre mit ssDNS immobilisierten Goldoberflächen standardmäßig auf 60°C, bevor die Hybridisierung stattfindet (Peterson et al. (2002)). Die eigenen Experimente konnten daher die Ergebnisse von Peterson et al. (2002) bestätigen. Die Stabilität der gebildeten Hybride wurde durch die Erhitzung auf 60°C nicht erhöht, jedoch bleibt die Absolutmenge des gebildeten Hybrids auch nach der Hybridisierung höher als die Absolutmenge im Standardprotokoll bei der Hybridisierung bei RT. Die Hybridmenge, die bei 37°C gebildet wurde, ist weniger stabil im Vergleich zum Standardprotokoll.

PBS-Lösungen mit modifiziertem kaliumgehalt bzw. unterschiedlicher Ionenstärke zur Hybridisierung zeigen geringe Unterschiede im Hybridisierungsverhalten. Eine Konzentration von 1 mmol/l MgCl_2 der Gegenstranglösung erweist sich als äußerst wirkungsvolle Methode, um die Absolutmenge an Hybrid zu steigern. Diese Feststellung konnte neben GS_{25} auch für GS_{20} und $\text{GS}_{25/3F}$ beobachtet werden. Der Effekt des Magnesiums führte zu gleichen Belegungsichten von GS_{25} und GS_{20} . Für $\text{GS}_{25/3F}$ wurde eine ähnlich hohe Menge Hybrid wie für GS_{25} ohne MgCl_2 gebildet. Eine erhöhte Menge an Absoluthybrid wurde auch auf einer dichter mit AS belegten Oberfläche ($18,5 \text{ pmol/cm}^2$) erhalten. Castelino *et al.* konnten ebenfalls eine Erhöhung der HE durch steigende Ionenstärke feststellen (Castelino et al. (2005)). In Untersuchungen für DNA-basierte Assays werden Mg-Ionen zur Neutralisation der Abstoßungskräfte besonders dicht gepackter der dsDNS (double stranded) auf der Goldoberfläche verwendet (Boon et al. (2002)).

Nach einer Desorption in PBS hingegen spielt das zweiwertige Magnesiumsalz offensichtlich keine Rolle mehr. Die Stabilität des Hybrids wird insgesamt herabgesetzt. Bereits nach 2 h Desorption war die Absolutmenge an Hybrid bei allen untersuchten Zustände unter der Hybridmenge der jeweils ohne MgCl_2 verwendeten GS. Die Desorptionslösung enthält kein MgCl_2 , daher wird angenommen, dass das Mg-Salz aus den DNS-Strängen herausgelöst wird. Da eine physiologische Umgebung nicht frei von Mg-Ionen sein muss, kann *in vivo* eine andere Freisetzung von MgCl_2 stattfinden und sich auf die Freisetzungskinetik von GS auswirken. Pascal *et al.* haben hingegen eine Stabilisierung verzweigter DNS-Motive durch Mg-Ionen in Lösung feststellen können (Pascal et al. (2012)). Die Wechselwirkung von Magnesium und DNS in Lösung und an Oberflächen immobilisierter DNS unterscheidet sich offensichtlich. MgCl_2 nimmt einen Großteil der Hürden zur Hybridisierung, wie die variierende GS-Stranglänge, Basenfehlpaarungen oder eine zu dichte AS-Immobilisierung und damit

verbundene Fehlhybridisierung in Form von Mehrfachhybrid. Angenommen wird eine Neutralisation der negativ geladenen ssDNS (Peterson et al. (2001)), was eine Hybridisierung mit ebenfalls negativen GS erleichtert.

6.4 Sterilisierungsbedingungen

Es wurde herausgefunden, dass eine γ -Sterilisierung eine herabgesetzte Hybridisierungsfähigkeit der AS zur Folge hat (s. Abb. 20). Reichert gruppiert in ihrer Arbeit DNS-Veränderungen, die durch die Gammasterilisierung auftreten, wie folgt: (1) Abtrennungen von Basen, (2) molekulare Anlagerungen und (3) Strangbrüche. Dabei kann zwischen direkten (Ionisierung der DNS) und indirekten Effekten (Reaktion von DNS mit Radikalen) unterschieden werden. In ihrer Arbeit wurden bereits Untersuchungen zum Schutz der immobilisierten AS während der Sterilisierung untersucht, wobei der Einsatz von Opfersträngen als Radikalfänger besonders effektiv wirkte (Reichert (2013)).

In eigenen Versuchen wurden verschiedene Vorbereitungen der Proben getroffen, um die immobilisierten AS bei der Sterilisierung zu schützen. Die Proben werden nach der AS-Immobilisierung sterilisiert. Dafür werden diese in einer aluminiumbeschichteten Sterilisierungspackung eingeschweißt. Die Aluminiumbeschichtung schließt Lichteinfall aus, sodass keine photokatalytische Reaktionen während des Transports und des Sterilisierungsprozesses selbst auftreten können. Das Einschweißen erfolgt stets nach einer Trocknung über Phosphorpentoxid und unter Argonatmosphäre, um das Vorhandensein von Sauer- oder Wasserstoff in der Umgebung zu und das Ionisierungspotential der Oligonukleotide zu verringern. Im Standardprotokoll findet das Einschweißen der Proben in einem Glovebag statt. Dieser Einschweißprozess stellt sich in der Durchführung als kompliziert dar, da die Proben möglichst unversehrt und unter Lichtausschluss in die Sterilisierungspackung versetzt werden sollen. Als Alternative zum Glovebag wurden Probenstücke in einer Argon befüllten Handschuhbox transferiert. Diese bietet vor allem den Vorteil kontrollierbarer Umgebungsbedingungen, wie der Luftfeuchtigkeit und dem Sauerstoffgehalt. Als weitere Schutzmöglichkeit wurde der Einsatz von Opfersträngen untersucht, welche anstelle der AS ionisiert werden können. Eine Modifizierung der Probenvorbehandlung konnte keinen Schutz der AS erzielt werden. Von keiner der untersuchten Methoden ist eine deutliche Verbesserung der Hybridisierbarkeit der AS abzuleiten. Jedoch konnte eine Notwendigkeit der Trocknungs- und Einschweiß-Prozedur bestätigt werden. Der Einsatz von 1 mmol/l MgCl_2 in der Hybridisierungslösung kann jedoch auch hier zu einer Verbesserung der Hybridisierung führen.

Nicht nur die initiale Hybridmenge konnte erhöht werden, auch die Hybridmengen im gesamten Desorptionsverlauf sind den Hybridmengen ohne MgCl_2 gegenüber erhöht. Möglich ist auch hier, dass die durch die Sterilisierung entstandenen Schäden der DNS durch die Wechselwirkungen mit MgCl_2 überbrückt werden können, sodass sich der Gegenstrang anlagern kann und die Belegungsdichte mit GS erhöht wird. Zudem konnte eine leichte Verbesserung der Hybridstabilität auf sterilen Probenstücken, vor allem bei GS_{20} , festgestellt werden.

Die Methode der Verwendung von OS, welcher nach der anodischen Polarisierung auf die immobilisierten AS gegeben wird, ist im Verhältnis zum Ergebnis eher unvorteilhaft, da vor allem viel Oligonukleotid-Material verbraucht wird. Die Optimierung der Verwendung der Handschuhbox hingegen kann sich als eine alternative Methode zum Glovebag auszahlen. In Kombination mit dem Zusatz von MgCl_2 kann das Problem der verminderten Hybridbildung durch Sterilisierungsschäden der Ankerstränge teilweise ausgeglichen werden.

6.5 Einflussfaktoren

In diesem Kapitel sollen prinzipielle Einflussfaktoren und mögliche Schwierigkeiten des untersuchten Immobilisierungssystems genannt werden.

Allgemein hängt der partielle Einbau der AS, und damit auch deren Zugänglichkeit der GS für die Hybridisierung, von dem Umfang der Oxidschichtverdickung während der anodischen Oxidation ab. Die Verdickung der Oxidschicht kann durch Parameter wie der Stromdichte und dem Abschaltpotential kontrolliert werden. In den vorgestellten Versuchen wurden diese Parameter konstant gehalten. Dennoch konnte festgestellt werden, dass die Dauer zum Erreichen des Abschaltpotentials teilweise variierte. Für die Dauer der Polarisierung ist die Potentialdifferenz zwischen Start- und Abschaltpotential entscheidend. Die Polarisationsdauer beeinflusst die Oxidschichtdicke. Die Experimente wurden mit sandgestrahlten und geätzten Proben durchgeführt. Wie in den Rasterelektronischen Aufnahmen (s. Abb. 5) erkennbar, ist die Oberfläche wabenartig strukturiert. Diese Feinstruktur variiert mit jeder Titanprobe und beeinflusst damit die Größe der Oberfläche. Damit ändert sich auch das Startpotential der Polarisierung. Eine Variation der Anodisierungszeit kann auch von dem Alter und der Position des Stromschlüssels oder einzelner Gegenelektroden abhängen. Beutner (2011) beschreibt als Schwachstellen der Oxidschicht die Durchstoßstellen immobilisierter AS. Vorgeschädigte AS, deren Bruchstelle sich im Oxid befindet sowie eine geringe Einbautiefe von AS kann dazu führen, dass die

Oligonukleotide leicht herausgelöst werden und die Belegungsdichte verringert wird (Beutner (2011)).

Weiterhin können die Hybridisierungssequenzen der AS durch die Fotoaktivität des Titanoxids geschädigt werden. Durch größtmöglichen Lichtausschluss während der Versuche und Messungen sowie bei Lagerung und Inkubation der Proben in Desorptionslösung wurde versucht eine Schädigung der ODNs zu verringern. Aufgrund logistischer Umstände konnte ein Kontakt der Proben mit Tageslicht nicht völlig ausgeschlossen werden.

Außerdem konnten Unterschiede in der Trocknungsdauer der Proben nach einer AS-Beschichtung festgestellt werden. Ursachen dafür sind Änderungen der Umgebungstemperatur oder Luftfeuchtigkeit. Die Dauer des Wasserentzugs von Proben kann Einflüsse auf die äußere Oxidschicht und darin verankerte Oligonukleotide haben. Immobilisierte Ankerstränge auf den Proben unterliegen damit verschiedenen Umordnungsprozessen und Konformationsänderungen, was zu unterschiedlich starken mechanischen Belastungen und Schädigungen der Stränge führt.

Allgemein unterliegt das untersuchte Immobilisierungssystem mehreren Einflüssen, welche Änderungen der Belegungsdichte und Intaktheit der Hybridisierungssequenzen zur Folge haben. Es empfiehlt sich daher, zusammenhängende Versuchsreihen in einer Charge durchzuführen. Dennoch sind weitere Standardisierungen des Immobilisierungssystems zu empfehlen. Eine konstante Luftfeuchtigkeit und Temperatur während der Trocknung der AS können einheitliche Konformationen der Stränge ermöglichen, und somit vergleichbare Voraussetzungen für die Hybridisierung geschaffen werden. Da gezeigt wurde, dass Temperaturänderungen die HE beeinflussen können, sollte auch bei Hybridisierungsversuchen bei konstanten und immer gleichen Temperaturen gearbeitet werden. Weiterhin ist es sinnvoll, unter denselben Belichtungsbedingungen zu arbeiten, da dabei die Schädigungen der AS verschiedener Beschichtungschargen als nahezu gleichartig betrachtet werden können.

Ein Austrocknen der Hybridisierungslösung muss beim Einsatz hoher Temperaturen dringend verhindert werden, was durch Vorhandensein von Wasser in Probennähe teilweise gewährleistet werden kann. Zudem sollte weiterhin ein Lichtausschluss gewährleistet werden.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Titan ist ein vielfältiger Werkstoff und wird aufgrund seinem günstigen Korrosionsverhalten und seinen vorteilhaften mechanischen Eigenschaften bereits als Implantatmaterial eingesetzt. Dennoch werden künstliche Implantate nicht ausreichend in das natürliche Gewebe integriert, wodurch vermehrt Implantatrevisionen auftreten können. Um die Adhäsion knochenbildender Zellen (Osteoblasten) spezifisch zu beeinflussen und damit die Integrität von Knochenimplantaten zu verbessern, soll an Titanoberflächen ein modulares Freisetzungssystem von Wachstumsfaktoren realisiert werden. Die regioselektive Immobilisierung von Oligonukleotiden durch partiellen Einbau in anodisch verdickte Oxidschichten auf Titanwerkstoffen soll das Prinzip der Doppelstrangbindung von DNS zur reversiblen Kopplung von Wachstumsfaktoren nutzen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den partiellen Einbau von AS zu untersuchen und eine Methode zur Verbesserung der Hybridisierbarkeit der Stränge zu herauszufinden. Im Hinblick auf eine zukünftige patientenspezifische Anpassung des Systems wurde ein weiteres Ziel dieser Arbeit verfolgt, indem das Hybridisierungs- und Freisetzungverhalten von Gegensträngen charakterisiert wurde. Dazu wurden die Belegungsdichten und Freisetzungskinetiken verschiedener GS (25 mer, 20 mer und 25 mer mit drei Fehlbasen) untersucht und Hybridisierungen bei modifizierten Bedingungen (Temperatur und Puffer) durchgeführt. Weiterhin sollte die Schädigung immobilisierter AS auf der Probe bei einer notwendigen Sterilisierung des Systems vermindert werden. Daher wurden die Proben auf unterschiedliche Arten auf den Sterilisierungsvorgang vorbereitet und anhand von Hybridisierungsexperimenten auf deren Wirkung untersucht.

Um einen Schutz der Hybridisierungsbereiche der AS vor Interaktion mit der Oberfläche zu erreichen, wurde eine kurze Spacersequenz eingeführt und mit dem AS koimmobilisiert. Entgegen anfänglicher Erwartungen konnte gezeigt werden, dass der AS bei gleichzeitiger Adsorption und anschließender Immobilisierung gleicher Konzentrationen von AS und Spacer auf der Oberfläche dominiert und der Spacer nicht zu einer verbesserten HE führt. Die Affinität des AS ist auch bei einem Verhältnis von AS und Spacer von 1:3 höher. Eine Vorbelegung der Oberfläche mit Spacer, gefolgt von einer Adsorption von AS und der anschließenden Immobilisierung konnte zu einer deutlich erhöhten HE führen. Ein Schutz der AS konnte erreicht werden. Es wird angenommen, dass vorgelegte Spacermoleküle die Interaktion von AS mit der Oberfläche verhindern, oder die AS räumlich voneinander trennen, sodass die Hybridbildung mit GS verbessert wird. In Bezug auf die eingesetzte Menge der AS

und dem benötigten Zeitaufwand konnte jedoch keine absolute Verbesserung des Immobilisierungssystems herbeigeführt werden.

Durch den Vergleich der absoluten Hybridmengen und der Freisetzung verschiedener Gegenstränge konnte ein Schritt in Richtung des in Aussicht gestellten Ziels der patientenspezifischen Implantatbeschichtung getan werden. Es konnte herausgefunden werden, dass eine um 5 mer verkürzte GS-Sequenz die HE erhöht und eine Sequenz mit Basenfehlpaarungen die HE herabsetzt. Weiterhin kann der Einsatz von MgCl_2 die negativen Ladungen der DNS neutralisieren und somit Absolutmenge von Hybrid generell erhöhen. Auch herabgesetzte HE bei Basenfehlpaarungen können dabei ausgeglichen werden. Eine Erhöhung der Hybridisierungstemperatur hat ebenfalls erhöhte Hybridmengen zur Folge. Eine verlangsamte Freisetzung von GS und eine erhöhte Stabilität des Hybrids konnte bei 37°C nicht erzielt werden. Bei 60°C wurde die Stabilität bei RT erhalten, aber die Absolutmenge an Hybrid erhöht. Allerdings können Wirkstoffe nicht bei 60° hybridisiert werden. Jedoch wurde die Stabilität des Hybrids bei Verwendung von MgCl_2 herabgesetzt. Dies kann an der Freisetzung des Magnesiums durch eine Mg-freie Desorptionsumgebung liegen. Hybride mit Basenfehlpaarungen zeigten gegenüber Hybrid mit komplementären Sequenzen eine geringere Stabilität. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Variation der Belagungsdichte mit AS die absolute Hybridmenge auf der Probe beeinflussen kann. Verbesserungen der Hybridisierungsfähigkeit von AS nach der Sterilisierung konnten nicht erzielt werden. Es konnte aber bestätigt werden, dass eine Trocknung der immobilisierten AS mit Argon erfolgen sollte, bevor die Proben für den Sterilisierungsprozess verpackt werden.

Zusammenfassend wurde das Ziel erreicht und es konnten Erkenntnisse zur Entwicklung des elektrochemisch gestützten Immobilisierungssystems von Ankersträngen zur Biofunktionalisierung der Titanoberfläche gewonnen werden. Für die Optimierung des Systems sollten zukünftig Einflüsse der Umgebung und damit verbundene Schädigungsprozesse minimiert werden. Nur so kann die Vergleichbarkeit der Proben und Immobilisierungs- sowie Hybridisierungsdaten einzelner Versuchsreihen gewährleistet werden. Dafür ist eine weitere Standardisierung des Systems notwendig. Auf eine einheitliche Luftfeuchtigkeit und Temperatur während der Trocknung der Ankerstränge nach dem Immobilisierungsprozess sollte fokussiert werden. Zudem ist eine gleichbleibende Beleuchtungssituation während der Versuche erforderlich.

8 Summary

Titanium is a versatile material and because of its favorable corrosion behavior and advantageous mechanical properties, it is widely used as a bone implant material. However, these artificial implants often fail to integrate with the native tissues and results in less desirable patient outcome. Specifically in order to influence the adhesion behavior of bone-forming cells (osteoblasts), thus improving the biocompatibility of bone implants, a modular delivery system of growth factors on titanium surfaces need to be created. The regiospecific immobilization of oligonucleotides, by partial incorporation in anodic thickened oxide layers on titanium surfaces, uses the basic principle of DNA complementarity to achieve reversible coupling of growth factors. The aim of this study was to investigate the optimum conditions for partial incorporation of anchor strands (AS) on titanium surfaces and improving the hybridization capacity. With regards to future patient-specific adaptation, another goal of this work was to characterise the hybridization and release behavior of complementary strands. Furthermore, damages to surface-immobilized anchor strands after sterilization should be reduced. Therefore, the samples were treated by different preparations prior to the sterilization step and hybridization efficiency of the AS was subsequently examined. To prevent hybridization sequence of the AS from interacting with the surface, a short spacer sequence was co-immobilized with the AS. Against initial expectations, it was observed that the AS could still dominate in surface density, if adsorption and subsequent immobilization of anchor strands and spacer was done concurrently. As a result, the spacer does not lead to improved hybridization efficiency. In contrast, a significant increase in hybridization efficiency was achieved when the titanium surface was pre-coated with spacer, followed by adsorption and subsequent immobilization of AS; showing that protection of anchor strands is achievable. Whether a spacer molecule prevents the AS from interacting with the surface or spatially separated the AS from each other, it is assumed that such protective measures are necessary to promote hybridization of AS with complementary strands. With respect to varying concentrations of AS and experimentation time, no absolute improvement of the immobilization system could be achieved.

A step towards the future objective of implementing patient-specific implant coating was made, by comparing the absolute concentration of hybrids and release behavior of various complementary strands. It was found that a 20-mer complementary strand, instead of 25-mer, increases the hybridization efficiency and a sequence of mismatched base pairs reduces the hybridization efficiency. Increasing the hybridization temperature, results in increased hybrid concentration. In addition, the use

of MgCl_2 can neutralize the negative charges of the DNA, and therefore generally increase the absolute concentration of hybrids. However, the stability of hybrids was reduced with the use of MgCl_2 and the reasons are not clear. Also hybridisation of mismatch base pairings with MgCl_2 are negligible. A slowed release of complementary strands was implemented to increase stability of hybrids, but have shown no effects. Comparing hybrids with mismatched base pairings and hybrids with complementary sequences, the mismatched sequences show a lower stability. It was also shown that a variation in coverage of anchor strands on sample surface can affect the absolute hybrid concentration. Improvements regarding the ability to hybridise the anchor strands after the sterilization step could not be obtained. It was confirmed, however, that drying the immobilized AS should be done with argon before the samples are packaged for sterilization process. In summary, the goal was achieved and important insights into the development of electrochemically-based immobilization system carrying oligonucleotide anchor strands for bio-functionalisation of titanium surfaces was gained. For future experiments, optimisation of the system regarding natural environmental influences and associated damage processes should be minimized. This arrangement could guarantee the comparability of samples, especially the immobilization and hybridization data of individual trials. Therefore, a further standardisation of the system is necessary. Furthermore, uniform temperature and humidity during the drying process after immobilization of anchor strands should also be focused and constant lighting conditions during the experiments are necessary.

Literatur

- Aladjem, A. (1973). Anodic oxidation of titanium and its alloys. *Journal Of Materials Science*, 8 (5):688–704.
- Beutner, R. (2011). *Elektrochemisch gestützte Immobilisation bioaktiver Moleküle an Titanoberflächen*. Dissertation, Technische Universität Dresden, Fakultät Maschinenwesen.
- Beutner, R., Michael, J., Förster, A., Schwenzer, B., and Scharnweber, D. (2009). Immobilization of oligonucleotides on titanium based materials by partial incorporation in anodic oxide layers. *Biomaterials*, 30 (14):2774–2781.
- Beutner, R., Michael, J., Schwenzer, B., and Scharnweber, D. (2010). Biological nano-functionalization of titanium-based biomaterial surfaces: a flexible toolbox. *fehlt noch*, 7 (1):93–105.
- Boehm, H. P. and Herrmann, M. (1967). Über die Chemie der Oberfläche des Titan-dioxids. I. Bestimmung des aktiven Wasserstoffs, thermische Entwässerung und Rehydroxylierung. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*, 352(3-4):156–167.
- Boon, E. M., Salas, J. E., and Barton, J. K. (2002). An electrical probe of protein–DNA interactions on DNA-modified surfaces. *Nature Biotechnology*, 20 (3):282 – 286.
- Boozer, C., Ladd, J., Chen, S., Yu, Q., Homola, J., and Jiang, S. (2004). DNA Directed Protein Immobilization on Mixed ssDNA/Oligo(ethylene glycol) Self-Assembled Monolayers for Sensitive Biosensors. *Analytical Chemistry*, 78(23):6967–6972.
- Castelino, K., Kannan, B., and Majumdar, A. (2005). Characterization of Grafting Density and Binding Efficiency of DNA and Proteins on Gold Surfaces. *American Chemical Society*, 21 (5):1956–1961.
- Chan, V., Graves, D. J., and McKenzie, S. (1995). The Biophysics of DNA Hybridization with Immobilized ODN Probes. *Biophysical Journal*, 69(6):2243–2255.
- Hiemstra, T. and Riemsdijk, W. H. (1996). A Surface Structural Approach to Ion Adsorption: The Charge Distribution (CD) Model. *Journal of Colloid and Interface Science*, 179(2):488–508.

- Keighley, S., Estrela, P. L. P., and Migliorato, P. (2007). Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(8):1291–1297.
- Khalil, N. and Leach, J. D. L. (1986). The anodic oxidation of valve metals - I. Determination of ionic transport numbers by alphaspectrometry. *Electrochimica Acta*, 31(10):1279–1285.
- Kunze, S., Ghicov, A., Hildebrand, H., Macak, J. M., Traveira, L., and Schmuki, P. (2005). Challenges in the Surface Analytical Characterisation of Anodic TiO₂ Films – a Review. *Applied Surface Science*, 219(11):1561–1582.
- Larsson, L., Esposito, M., Liao, H., and p. Thomsen (2001). The Titanium-Bone Interface in Vivo. In Brunette, D., Tengvall, P., Textor, M., and Thomsen, P., editors, *Titanium In Medicine*, chapter 17, pages 587–648. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Lausmaa, J., Kasemo, B., and Mattsson, H. (1990). Surface Spectroscopic Characterization of Titanium Implant Materials. *Applied Surface Science*, 44(2):133–146.
- McCafferty, E. and Wightman, J. P. (1998). Determination of the concentration of surface hydroxyl groups on metal oxide films by a quantitative XPS method. *Surface and Interface Analysis*, 26(8):549–564.
- Michael, J., Beutner, R., Scharnweber, D., Hempel, U., Worch, H., and Schwenzer, B. (2006). Surface Modification of Titanium-Based Alloys With Bioactive Molecules Using Electrochemically Fixed Nucleic Acids. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 80B(1):146–155.
- Pascal, T. A., Goddard, W. A., Maiti, P. K., and Vaidehi, N. (2012). Role of Specific Cations and Water Entropy on the Stability of Branched DNA Motif Structures. *Journal of Physical Chemistry B*, 116 (40):12159–12167.
- Peterson, A. W., Heaton, R. J., and Geogiadis, R. M. (2001). Surface Electrostatic Effects in Oligonucleotide Microarrays: Control and Optimization of Binding Thermodynamics. *Nucleic Acids Research*, 29(24):5163–5168.
- Peterson, A. W., Wolf, L. K., and Georgiadis, R. M. (2002). Hybridization of Mismatched or Partially Matched DNA at Surfaces. *Journal Of The American Chemical Society*, 124 (49):14601–14607.

- Reichert, J. (2013). *Charakterisierung eines Nukleinsäure-basierten Immobilisierungssystems zum Biosurface-Engineering*. Dissertation, Technische Universität Dresden, Fakultät Maschinenwesen.
- Rößler, S., Zimmermann, R., Scharnweber, D., Werner, C., and Worch, H. (2002). Characterization of oxide layers on Ti6Al4V and titanium by streaming potential and streaming current measurements. *Applied Surface Science*, 44(2):387–395.
- Scharnweber, D., Beutner, R., Rößler, S., and Worch, H. (2002). Electrochemical behavior of titanium-based materials – are there relations to biocompatibility? *Journal Of Materials Science: Materials In Medicine*, 13 (12):1215–1220.
- Scharnweber, D., Beutner, R., Roessler, S., Michael, J., and Schwenzer, B. (2009). Using electrochemical approaches for bio surface engineering of titanium based implants. In Karlinsey, R., editor, *Recent Developments In Advanced Medical And Dental Materials Using Electrochemical Methodologies*, chapter 5, pages 101–161. Research Signpost, Indianapolis, USA.
- Steel, A. B., Herne, T. M., and Tarlov, M. J. (1998). Electrochemical Quantitation of DNA Immobilized on Gold. *Analytical Chemistry*, 70 (22):4670–4677.
- Steel, A. B., Levicky, R. L., Herne, T. M., and Tarlov, M. J. (2000). Immobilization of Nucleic Acids at Solid Surfaces: Effect of Oligonucleotide Length on Layer Assembly. *Biophysical Journal*, 70 (22):975–981.
- Tengvall, P. (2001). Proteins at Titanium Interfaces. In Brunette, D., Tengvall, P., AND Textor, M., and Thomsen, P., editors, *Titanium In Medicine*, chapter 14, pages 457–484. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Textor, M., Sittig, C., Frauchiger, V., Tosatti, S., and Brunette, D. (2001). Properties and Biological Significance of Natural Oxide Films on Titanium and Its Alloys. In Brunette, D., Tengvall, P., Textor, M., and Thomsen, P., editors, *Titanium In Medicine*, chapter 7, pages 171–230. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Thevenot, P., Hu, W., and Tang, L. (2008). Surface Chemistry Influences Implant Biocompatibility. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 8 (4):270–280.
- v. Steenberghe, D., Quirynen, M., Molly, L., and Jacobs, R. (2003). Impact of systemic diseases and medication on osseointegration. *Periodontology 2000*, 33 (1):163–171.

- Vainrub, A. and Pettitt, B. M. (2003). Surface Electrostatic Effects in Oligonucleotide Microarrays: Control and Optimization of Binding Thermodynamics. *Biopolymers*, 68 (2):265–270.
- Vanhumbeeck, J.-F. and J.Proost (2009). Current Understanding of Ti Anodisation: Functional, Morphological, Chemical and Mechanical Aspects. *Corrosion Reviews*, 27 (3):117–204.

Anhang

A.1 Voruntersuchungen des Ankerstrangs

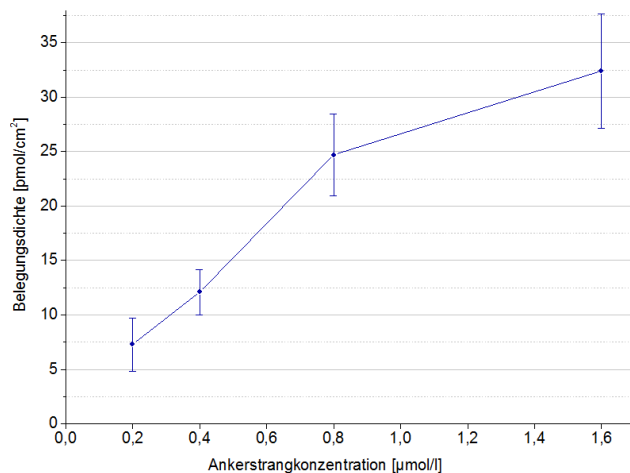


Abbildung 24: Abhängigkeit der Belegungsdichte an AS von der eingesetzten Ankerstrang-Konzentration in der Immobilisierungslösung. (n=9)

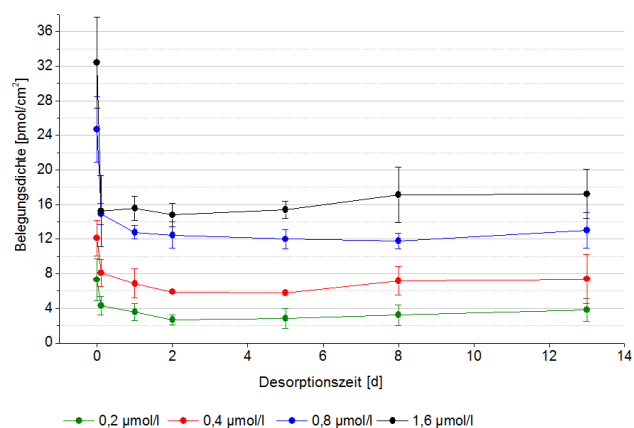


Abbildung 25: Kinetik Belgungsdichte von AS bis zu 13 Tagen nach der Immobilisierung bei verschiedenen eingesetzten AS-Konzentrationen. Lagerung bei 37°C in Desorptions-Puffer. (n=9)

A.2 Kinetik der Belegungsdichte bei sequentieller Adsorption

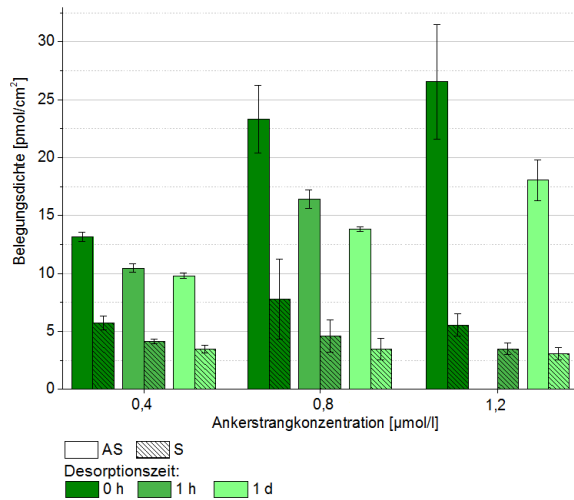


Abbildung 26: Kinetik der Belegungsdichte von Ankerstrang und Spacer. Je 0,4; 0,8 und 1,2 µmol/l AS wurden nach 0,2 µmol/l Spacer adsorbiert und anschließend immobilisiert. Lagerung bei 37°C in Desorptions-Puffer. (n=3)

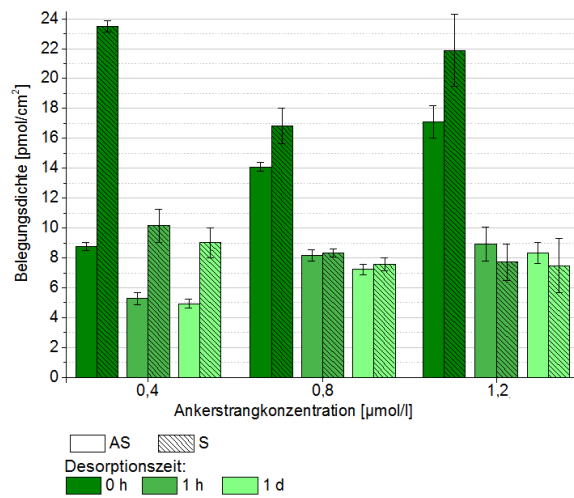


Abbildung 27: Kinetik der Belegungsdichte von Ankerstrang und Spacer. Je 0,4; 0,8 und 1,2 µmol/l AS wurden nach 1,2 µmol/l Spacer adsorbiert und anschließend immobilisiert Lagerung bei 37°C in Desorptions-Puffer. (n=3)

A.3 Kinetik des Hybrids bei sequentieller Adsorption

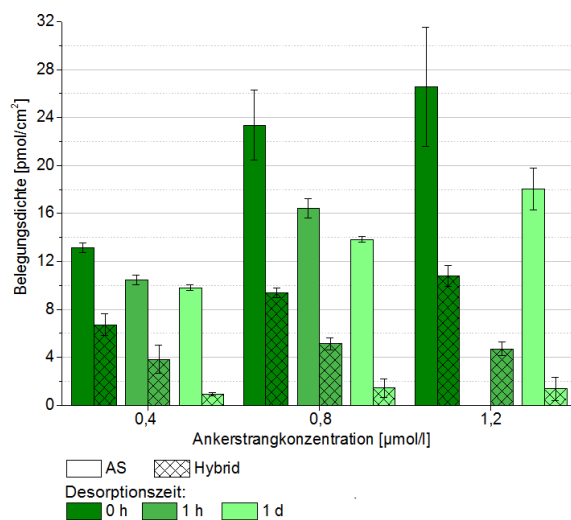


Abbildung 28: Kinetik der Belegungsdichte von GS₂₅. 0,2 $\mu\text{mol/l}$ Spacer wurden vor dem AS (0,4; 0,8 und 1,2 $\mu\text{mol/l}$) adsorbiert und anschließend immobilisiert. Lagerung bei 37°C in Desorptions-Puffer. ($n \geq 3$)

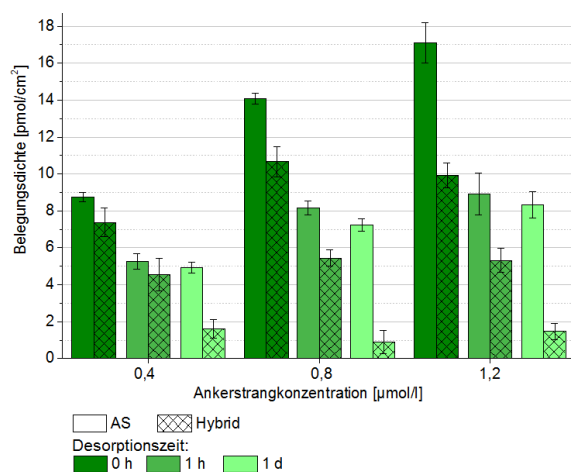


Abbildung 29: Kinetik der Belegungsdichte von GS₂₅. 1,2 $\mu\text{mol/l}$ Spacer wurden vor dem AS (0,4; 0,8 und 1,2 $\mu\text{mol/l}$) adsorbiert und anschließend immobilisiert. Lagerung bei 37°C in Desorptions-Puffer. ($n \geq 3$)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe für Biomaterial-Entwicklung am Max-Bergmann-Zentrum für Biomaterialien des Instituts für Werkstoffwissenschaft an der Technischen Universität Dresden angefertigt.

Ein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Petra Radehaus und dem Arbeitsgruppenleiter Herrn Prof. Dr. habil. Dieter Scharnweber für die wissenschaftliche Unterstützung und Betreuung meiner Masterarbeit vonseiten der Hochschule Mittweida bzw. der Technischen Universität Dresden.

Frau Dr. Cornelia Wolf-Brandstetter danke ich ganz herzlich für ihre kompetente Betreuung, die aufschlussreichen Diskussionen und die gute Zusammenarbeit.

Für die immer freundliche und aufgeschlossene Atmosphäre am Max-Bergmann-Zentrum, insbesondere in der Arbeitsgruppe, bedanke ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen. Frau Heike Zimmermann und Herrn Dr. René Beutner danke ich vor allem für ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern des Zentralen Radiolabors der TU Dresden Herrn Dr. Taut, Frau Dr. Acker, Herrn Krause und Frau Kobus für die Nutzung der Laborräume. Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Ritter und Frau Mühle für deren Hilfe bei der Ätzung der Proben bzw. bei der REM-Aufnahme.

Abschließend bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden, die mich in allen Lebenslagen unterstützen und mir ein ständiger Antrieb sind.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit eigenständig verfasst zu haben. Ich habe ausschließlich mit der im Quellenverzeichnis angegebenen Literatur und Hilfsmittel gearbeitet. Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Vanessa Hänchen